



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2010

**Elisa Maria Monteiro
da Costa**

Permeação de Emulsões Comerciais de Diclofenac



**Elisa Maria Monteiro
Da Costa**

Permeação de Emulsões Comerciais de Diclofenac

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Doutor João António Batista Pereira de Oliveira
Professor Associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Alberto António Caria Canelas Pais
Professor Associado com agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial à Dra. Teresa Gomes pelo apoio, orientação e motivação que me foi prestando ao longo do trabalho. Ao Dr. João Oliveira o meu obrigado pela disponibilidade e ajuda prestada sempre que solicitada.

Quero agradecer também ao Sr. Ivo do Departamento de Física e ao Sr. Morais do Departamento de Química pela ajuda técnica, e ao Dr. Alberto Pais por me ter fornecido a pele humana.

A nível pessoal queria agradecer aos meus colegas de laboratório e de Mestrado pela ajuda e pelos bons momentos que tornaram este percurso um pouco melhor.

Aos amigos que me aturaram ao longo de todo este tempo, o meu muito, mas mesmo muito obrigado!

E por último, mas não menos importante, quero agradecer aos meus pais pelo apoio e por me terem dado esta oportunidade.

palavras-chave

Permeação, difusão, diclofenac de sódio, celofane, pele humana, microbalança de cristais de quartzo

resumo

O diclofenac de sódio é um composto utilizado pela indústria farmacêutica devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e anti-reumáticas. Em muitos casos o diclofenac é aplicado por via transdérmica, sendo necessário o seu controlo nas formulações, o que acontece pelo conhecimento da permeação do medicamento através da pele.

Vários métodos são utilizados para estudar a permeação, mas estes necessitam da recolha da amostra da câmara receptora ao longo da experiência, alterando as condições de permeação.

O objectivo deste trabalho é desenvolver um método analítico utilizando uma microbalança de cristais de quartzo para estudar a permeação através da pele, em tempo real.

Para a realização do presente trabalho foram utilizadas membranas de celofane e pele humana, e foi estudada a permeação de duas emulsões comerciais: o Voltaren Emulgel® e o Diclofenac Gel Cinfa®.

Para ambas, foram determinados o coeficiente de difusão e o fluxo do diclofenac de sódio, tendo-se obtido para a membrana de celofane, valores de $D=3,63 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{h}$ e $J=4,37 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$, para o Voltaren Emulgel® e de $D=4,53 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{h}$ e $J=9,65 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ para o Diclofenac Gel Cinfa®. Para a pele, obteve-se com o Voltaren Emulgel um coeficiente de difusão $D=7,84 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{h}$ e um fluxo $J=2,36 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$.

Os coeficientes de difusão para ambas as membranas são da mesma ordem de grandeza (10^{-7}), o que confirma a utilidade do celofane nestes estudos, como membrana modelo sempre que não é possível a utilização da pele. Quanto à média dos valores do fluxo obtida para a pele, e com o Voltaren Emulgel®, ela é igual ao valor encontrado na literatura, o que permite concluir que o novo método baseado na microbalança de cristais de quartzo conduz a resultados exactos e mesmo mais precisos do que os reportados com a célula de Franz na realização dos estudos de permeação.

keywords

Permeation, diffusion, sodium diclofenac, cellophane, human skin, quartz crystal microbalance

abstract

Sodium diclofenac is a compound used by the pharmaceutical industry because of its anti-inflammatory, antipyretic and anti-rheumatic properties.

In many cases, the diclofenac is applied transdermally, being necessary its control in the formulations, what happens upon the knowledge of the drug permeation through the skin.

Several methods are used to study the permeation, but they require the collection of the sample of the receiving chamber throughout the experiment, what changes the conditions of permeation.

The purpose of this study is to develop an analytical method using a quartz crystal microbalance to study the permeation through the skin in real time.

In the realization of this work, were used cellophane and human skin as membranes, and the permeation of two commercial emulsions, Voltaren Emulgel[®] and Diclofenac Gel Cinfa[®], were studied

For both, we determined the diffusion coefficient and the flux of sodium diclofenac. For the cellophane membrane, the values were $D=3,63 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{h}$ and $J=4,37 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ for Voltaren Emulgel[®], and $D=4,53 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{h}$ and $J=9,65 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ for Diclofenac Gel Cinfa[®]. For the skin a diffusion coefficient of $D=7,84 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{h}$ and a flux of $J=2,36 \times 10^{-3} \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$ were obtained with Voltaren Emulgel[®]. The diffusion coefficients found are all in the 10^{-7} range, which confirms the usefulness of the studies in cellophane as a model membrane, whenever the use skin is not available.

The average of the flux values obtained for the skin, with the Voltaren Emulgel[®], is equal to the value found in the literature, which proves that the new method based on quartz crystal microbalance leads to accurate results. In fact the results were even more precise than those reported with the Franz cell.

Índice

1. Introdução Geral	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Diclofenac de Sódio	7
2.1.1. Características e Propriedades do Diclofenac de Sódio	7
2.1.2. Acção do Diclofenac de Sódio no Organismo	8
2.1.3. Utilização Transdérmica do Diclofenac de Sódio	9
2.2. A Permeação através da Pele	10
2.2.1. A Pele	10
2.2.2. Teoria da Permeação	12
2.3. Técnicas Analíticas utilizadas nos Estudos de Permeação	15
2.3.1. A Célula de Difusão	15
2.3.2. Métodos Analíticos	16
2.4. Microbalança de Cristais de Quartzo	18
2.4.1. Cristais Piezoeléctricos de Quartzo	18
2.4.2. Fundamentos Teóricos da QCM	21
2.4.3. Sensores Acústicos Líquidos	23
2.4.4. Revestimento do Cristal	24
3. Instrumentação e Procedimento Experimental	27
3.1. O Sensor	29
3.1.1. Reagentes e Material	29
3.1.2. Revestimento do Cristal	30
3.2. Estudos de Permeação de uma Solução de Diclofenac de Sódio	30

3.2.1. Reagentes e Material	31
3.2.2. A Montagem Experimental	31
3.2.3. Procedimento Experimental	32
3.3. Estudos de Permeação para as Emulsões Comerciais	32
3.3.1. Reagentes e Material	33
3.3.2. A Célula de Permeação	34
3.3.3. Montagem da Célula de Permeação	35
3.3.4. Requisitos Experimentais	36
3.3.5. Arranjo Experimental	37
3.3.6. Procedimento Experimental	38
3.3.7. Avaliação de possíveis Interferências provenientes dos Ingredientes das Emulsões	39
4. Tratamento dos Dados e Discussão	41
4.1. Testes de Permeação de uma Solução de Diclofenac de Sódio	43
4.2. Testes de Permeação para as Emulsões Comerciais	47
4.2.1. A Calibração	48
4.2.2. Testes de Permeação através duma Membrana de Celofane	49
4.2.3. Testes de Permeação através da Pele Humana	54
4.2.4. Avaliação do Método Desenvolvido para o Estudo da Permeação	56
5. Conclusão	59
6. Bibliografia	63

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados para o revestimento do cristal de quartzo	29
Tabela 3.2 – Reagentes utilizados para os testes de permeação de uma solução de diclofenac de sódio	31
Tabela 3.3 – Reagentes utilizados na preparação da solução tampão fosfato	33
Tabela 3.4 – Espessuras das membranas utilizadas	33
Tabela 3.5 – Características das emulsões utilizadas	34
Tabela 3.6 – Reagente utilizado na preparação da solução da emulsão	40
Tabela 4.1 – Valores obtidos da concentração e da variação da frequência para a calibração dos testes de permeação para as soluções de diclofenac de sódio	43
Tabela 4.2 – Equações das rectas de calibração e respectivo coeficiente de correlação para as permeações da solução de diclofenac de sódio	44
Tabela 4.3 – Valores obtidos para o tempo de latência, coeficiente de difusão e fluxo para as várias concentrações da solução de diclofenac de sódio	47
Tabela 4.4 – Valores obtidos da concentração e da variação da frequência para a calibração dos testes de permeação para as emulsões comerciais	48
Tabela 4.5 – Equações da recta de calibração e respectivo coeficiente de correlação para as emulsões comerciais de diclofenac	49
Tabela 4.6 – Valores obtidos para o tempo de latência, coeficiente de difusão e fluxo das emulsões comerciais	53
Tabela 4.7 – Componentes constituintes das emulsões comerciais	53
Tabela 4.8 – Valores obtidos para o tempo de latência, coeficiente de difusão, fluxo e coeficiente de permeação do Voltaren Emulgel através duma membrana de pele humana	55
Tabela 4.9 – Valores obtidos para a calibração da acumulação da concentração de diclofenac de sódio	56
Tabela 4.10 – Valores médios de resposta para as soluções dos géis	57
Tabela 4.11 – Valores obtidos por Sintov <i>et al.</i> [32] para o fluxo e para o coeficiente de permeação com a pele de porco e rato e os resultados obtidos para a pele humana neste trabalho	58
Tabela 4.12 – Valores obtidos para o tempo de latência e fluxo do Voltaren Emulgel	58

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Diclofenac de Sódio	8
Figura 2.2 – Esquema representativo das várias camadas da pele	11
Figura 2.3 – Representação esquemática dos caminhos de transporte de agentes terapêuticos através do estrato córneo	12
Figura 2.4 – Diagrama típico de medições experimentais Q_t/A em função do tempo	15
Figura 2.5 – Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz utilizada em permeações de compostos através da pele	16
Figura 2.6 – Estrutura cristalina do quartzo com representação dos eixos ordenados	19
Figura 2.7 – Orientação dos cortes (a) AT e (b) BT	20
Figura 2.8 – Cristal piezoelétrico de quartzo	20
Figura 2.9 – Modo de cisalhamento da espessura para um cristal piezoelétrico de corte AT	21
Figura 2.10 – Modo de cisalhamento para o cristal de quartzo em meio líquido	24
Figura 2.11 – Efeito do pH na resposta do revestimento	25
Figura 3.1 – Imagem representativa do spin coater	30
Figura 3.2 – Representação esquemática da célula de difusão horizontal com o sensor piezoelétrico	31
Figura 3.3 – Célula de permeação modificada com o sensor piezoelétrico	35
Figura 3.4 – Câmara receptora da célula de permeação modificada	35
Figura 3.5 – Representação esquemática (a) e imagem (b) da célula de difusão modificada montada	36
Figura 3.6 – Montagem experimental utilizada nos ensaios de permeação das emulsões	38
Figura 4.1 – Gráfico da recta de calibração para as permeações da solução de diclofenac de sódio	44
Figura 4.2 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação de uma solução de diclofenac de sódio	45

Figura 4.3 – Gráfico da concentração em função do tempo para a permeação de uma solução de diclofenac de sódio, com 400μL colocados na câmara doadora	45
Figura 4.4 – Gráfico da quantidade permeada em função do tempo	46
Figura 4.5 – Gráfico da recta de calibração para as permeações das emulsões comerciais	48
Figura 4.6 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação para o (a) Voltaren Emulgel e (b) Diclofenac Gel Cinfa	50
Figura 4.7 – Gráfico da concentração de diclofenac em função do tempo para a permeação das emulsões comerciais (a) Voltaren Emulgel e (b) Diclofenac Gel Cinfa	51
Figura 4.8 – Gráficos da quantidade permeada em função do tempo para os géis (a) Voltaren Emulgel e (b) Diclofenac Gel Cinfa	52
Figura 4.9 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação através da pele humana	54
Figura 4.10 – Gráfico da concentração de diclofenac em função do tempo para a permeação através da pele humana	54
Figura 4.11 – Gráfico da quantidade permeada em função do tempo para a pele humana	55
Figura 4.12 – Recta de calibração para os testes aos componentes do gel	57

Lista de símbolos

<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>
AINE	Anti-inflamatório não -esteróide
COX	Ciclogenase
UV-Vís	Ultravioleta-Visível
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSC	Calorimetria de varrimento diferencial
PVC	Policloreto de vinilo
HDPB	Brometo de hexadecilpiridínio
DBP	Ftalato de dibutilo
THF	Tetrahidrofurano
QCM	Microbalança de cristais de quartzo
θ	Tempo de latência
P	Coeficiente de permeação
D	Coeficiente de difusão
J	Fluxo
l	Espessura da membrana
t	Tempo
A	Área de difusão
Q	Quantidade permeada
K	Coeficiente de partição
x	Coordenada espacial na direcção do fluxo
C_1	Concentração de gel na câmara doadora
C_2	Concentração à superfície da membrana na câmara receptora
C	Concentração na câmara receptora
$V_{\text{acumulado}}$	Volume total acumulado
$\Delta F_{\text{acumulado}}$	Variação da frequência acumulada

F_i	Frequência inicial
F_f	Frequência final
ΔF	Variação da frequência
$C_{\text{câmara doadora}}$	Concentração na câmara doadora
m_{total}	Massa total permeada
V_{tr}	Velocidade de propagação da uma onda transversal ao plano do cristal
e	Espessura do cristal
N	Constante de frequência
ΔM_f	Massa do filme
a	Área activa do cristal
ρ_p	Densidade do quartzo
μ_q	Modo de cisalhamento
η	Viscosidade do líquido

1. Introdução Geral

O diclofenac de sódio tem sido largamente utilizado devido ao seu efeito anti-pirético, analgésico e anti-reumático. Embora o diclofenac exista comercialmente em várias formas, devido aos seus efeitos secundários, a administração tópica do medicamento é vista como uma alternativa à administração oral. A fim de potenciar o efeito do medicamento, torna-se necessário o estudo das formulações e das dosagens do mesmo, recorrendo-se para isso a estudos de permeação através da pele. Apesar de idealmente a realização destes testes dever ser feita em humanos, tal não acontece frequentemente, por se levantarem questões éticas, devido à toxicidade de muitas substâncias e aos custos elevados exigidos para tal. Assim, e apesar de muitas vezes os testes serem de facto realizados com pele humana, recorre-se a metodologias laboratoriais onde são utilizadas soluções que simulam os fluidos corporais.

Embora na literatura seja possível encontrar uma série de métodos analíticos para os estudos da permeação do diclofenac de sódio através da pele, continua a procura de métodos mais baratos, eficazes e simples. Assim, e como objectivo principal deste trabalho, procurou-se desenvolver um novo método analítico para a realização dos ensaios de permeação desta substância, que para além de barato e proporcionar análises em tempo real, permitiu obter resultados fiáveis. O novo método foi testado com várias emulsões comerciais e membranas naturais e sintéticas.

Começou-se por desenvolver um sensor capaz de determinar o diclofenac de sódio e uma célula de difusão que permitisse acoplar o sensor baseado em cristais piezoeléctricos de quartzo. Seguidamente foi necessário criar uma montagem experimental e encontrar as condições necessárias para a realização dos ensaios de permeabilidade e por último, foram realizados os respectivos testes, onde se pôde concluir que o método é de facto confiável e funcional.

O presente trabalho encontra-se dividido em seis capítulos, sendo que o primeiro corresponde à introdução geral onde é clarificado o objectivo principal do estudo. A segunda parte destina-se à revisão bibliográfica. Aqui se fala sobre a importância do diclofenac de sódio, a estrutura da pele, a teoria da permeação, os métodos usados no seu estudo e o funcionamento dos sensores de massa.

Numa terceira parte são apresentados os aspectos experimentais onde se discute toda a montagem experimental e se encontram detalhados os procedimentos e metodologias utilizados. A quarta parte consiste no tratamento e na análise dos resultados obtidos, a quinta parte nas conclusões gerais do trabalho e por último, na sexta parte pode ser encontrada a bibliografia utilizada na realização do presente trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

Ao longo das últimas décadas o interesse em explorar novas técnicas de modulação de drogas através da pele tem aumentado. Os estudos de absorção percutânea realizados *in vitro* são uma boa forma de identificar quão longe determinada droga pode penetrar através da pele. Estes estudos, ao permitirem determinar a libertação do ingrediente activo da sua forma semi-sólida tornaram-se importantes quer para a indústria farmacêutica quer para as autoridades reguladoras [1]. Os dados sobre a passagem de substâncias através da pele permitem a avaliação da eficiência de alguns veículos e excipientes [2].

2.1. Diclofenac de Sódio

2.1.1. Características e Propriedades do Diclofenac de Sódio

Os anti-inflamatórios não-esteróides (*AINEs*), conhecidos pela humanidade há cerca de cem anos, são medicamentos de venda livre e de fácil acesso, e estão disponíveis em inúmeras apresentações. São conhecidos mais de 50 fármacos incluídos nesta classificação, formando um grupo heterogéneo de compostos, que compartilham certas acções terapêuticas e efeitos adversos. Esta classe de medicamentos caracterizada por ser a mais prescrita por médicos e dentistas (cerca de 5% de todos os medicamentos prescritos [3]) é consequentemente a mais consumida [4], embora todos os *AINEs* disponíveis apresentem efeitos indesejáveis significativos.

Na segunda metade da década de 60 deu-se o início da divulgação de processos de preparação de derivados substituídos do ácido-2-anilino-fenilacético [5]. Um exemplo destes derivados é o diclofenac. O diclofenac é um composto sintético não esteroide que pode ser encontrado nas formas de sal de sódio ou de potássio [6]. Sendo utilizado em cerca de 120 países diferentes é provavelmente o AINE mais usado em todo o mundo [4, 7]. Isto deve-se aos seus elevados efeitos analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios [8, 9, 10] que permitem o tratamento de artrites reumatóides, lesões desportivas e doenças articulares degenerativas, assim como dor resultante de cirurgias menores e traumas [9, 11, 12]. O diclofenac, normalmente utilizado na forma de sal sódico (Figura 2.1), encontra-se presente em inúmeras preparações farmacêuticas, na forma de comprimidos, supositórios, ampolas para injeção ou emulsões [12].

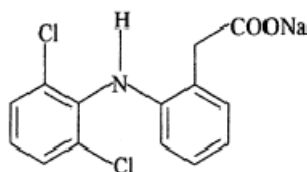


Figura 2.1 – Diclofenac de sódio [11].

A sua comercialização começou no Japão em 1974 sendo posteriormente introduzido nos Estados Unidos em 1989. Em 2001 a sua venda anual correspondia a cerca de 1 bilião de euros, onde cerca de 15% se deviam aos remédios de uso tópico [13], uma vez que o diclofenac mostrou ser o medicamento mais eficiente na área da reumatologia. Cerca de 25mg da droga no organismo garantem bons efeitos analgésicos, o que corresponde a uma concentração terapêutica de diclofenac no tecido a ser tratado, de aproximadamente 0,5µg/g de tecido [14].

2.1.2. Acção do Diclofenac de Sódio no Organismo

O efeito causado pelos fármacos resulta de um conjunto complexo de processos, que podem ser distinguidos em três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica. Na fase farmacêutica, ou fase de exposição, dá-se a desintegração da forma em que o fármaco é administrado. Na fase farmacocinética ocorre a absorção, distribuição, metabolização e excreção do fármaco. Por último, a fase farmacodinâmica compreende o processo de interacção do fármaco com o seu receptor, de onde resulta o estímulo, que depois de uma série de fenómenos químicos e bioquímicos, se traduz no efeito biológico esperado [5].

O diclofenac é rápida e eficientemente absorvido no tracto gastrointestinal, seguindo-se a sua rápida absorção; é depois extensivamente metabolizado no fígado, rins e sangue e finalmente, é eliminado por excreção urinária [5, 15]. O seu tempo de meia vida biológico é muito curto, o que o torna adequado para o tratamento de estados dolorosos ou inflamatórios agudos, e portanto deve ser administrado frequentemente.

Embora o mecanismo de acção do diclofenac não tenha sido ainda claramente esclarecido, a grande maioria dos seus efeitos terapêuticos aparecem associados à inibição da ciclogénase (COX), enzima envolvida na biosíntese da prostaglandina, que tem grande propensão em induzir inflamações (resultando em dor), baixar ou elevar a pressão arterial e elevar a temperatura corporal (causando febre) [3, 5, 11, 16].

Esta droga apresenta alguns efeitos adversos no estômago e nos intestinos [7, 8], podendo provocar também dores de cabeça, tonturas e edemas [9] quando administrado por via oral e lesões cutâneas quando administrado por injeções intramusculares [2]. Os efeitos adversos devem-se sobretudo à falta de especificidade do agente, o que resulta da ligação da droga a certos receptores. Estes efeitos são contudo menos frequentes e menos graves do que os verificados com a utilização da aspirina ou da indometacina [16].

É vantajosa a aplicação transdérmica do fármaco, de modo a aumentar o seu efeito farmacológico, sem as desvantagens dos efeitos secundários verificados na administração por via oral [7]. De facto, a administração tópica do diclofenac permite obter concentrações deste no tecido que ultrapassam em muito o necessário para a inibição de COX [15].

2.1.3. Utilização Transdérmica do Diclofenac de Sódio

Embora a administração transdérmica de drogas através da pele apresente vantagens relativamente à administração oral ou intravenosa, esta não é uma tarefa fácil. A pele é a primeira linha de defesa do organismo e a principal barreira na administração tópica de drogas. Compostos ionizáveis, ácidos ou básicos, penetram o epitélio córneo essencialmente na sua forma não ionizada, por ser mais lipossolúvel. A taxa e a extensão do transporte transcórneo são influenciadas pela fracção de moléculas ionizadas e não ionizadas, que por sua vez dependem do pKa da droga e do pH da formulação [17]. A maioria dos AINEs, são fracos ionizadores ácidos ao pH do fluido corporal reduzindo a penetração da droga e a taxa de permeação e consequentemente, o seu potencial.

As soluções aquosas de diclofenac de sódio são química e fisicamente instáveis, sendo a capacidade de permeação da droga reduzida, devido às suas características físico-químicas [7]. Assim, as emulsões são as formas mais comumente encontradas nos produtos de tratamento da pele. Por definição, uma emulsão é um sistema de duas ou mais substâncias imiscíveis onde uma se encontra dispersa ou suspensa na outra [18].

Neste trabalho utilizou-se o diclofenac de sódio na forma de dois géis comerciais: Voltaren Emulgel® e do Diclofenac Gel Cinfra®, desenvolvidos especificamente para a administração percutânea.

A profundidade da permeação do diclofenac na pele é limitada devido à solubilidade da droga ser relativamente baixa em sistemas aquosos e pela rápida libertação desta. Também

a baixa permeabilidade da pele se apresenta como um obstáculo. Deste modo, na formulação do gel são utilizados uma série de excipientes de modo a superar esta barreira.

Na formulação de géis baseados em água, como o Voltaren Emulgel® e o Diclofenac Gel Cinfa®, foram utilizados vários ingredientes não – medicinais como o propilenoglicol, óleo de parafina, isopropanol, propilparabeno e dietilamina. A mistura dos vários excipientes procura aumentar o potencial da droga, facilitando a sua passagem através da pele por uma série de caminhos diferentes. Esta é feita pela utilização de mecanismos como a alteração da actividade termodinâmica da pele ou interacções específicas com o estrato córneo [19].

A água é o elemento mais natural e maioritário na formulação de géis. O estado de hidratação do estrato córneo é importante para a penetração da droga que se pretende administrar. Normalmente, o aumento de hidratação deste permite um fluxo de permeação transdérmico [19]. O propilenoglicol [20] é utilizado como veículo para aumentar a entrega transdérmica de drogas. Também a dietilamina apresenta aqui um papel importante uma vez que promove a partição da droga nas bicamadas lipídicas da pele [19]. Quanto ao óleo de parafina, este apresenta um papel de veículo oclusivo ou seja, ajuda a evitar a perda de água da epiderme e a aumentar a absorção do composto activo [18]. Já o propilparabeno reparte-se no estrato córneo e quebra a estrutura organizada da bicamada lipídica, facilitando deste modo a passagem da droga [19].

2.2. Permeação através da Pele

2.2.1. A Pele

Sendo a pele o maior órgão do corpo humano, que naturalmente pretende prevenir a entrada de substâncias estranhas no organismo em vez de facilitar a penetração de drogas [21], é essencial o conhecimento das suas propriedades de transporte. A pele é constituída por tecidos em multicamadas formados pelo estrato córneo, a epiderme e a derme, como se pode ver na Figura 2.2.

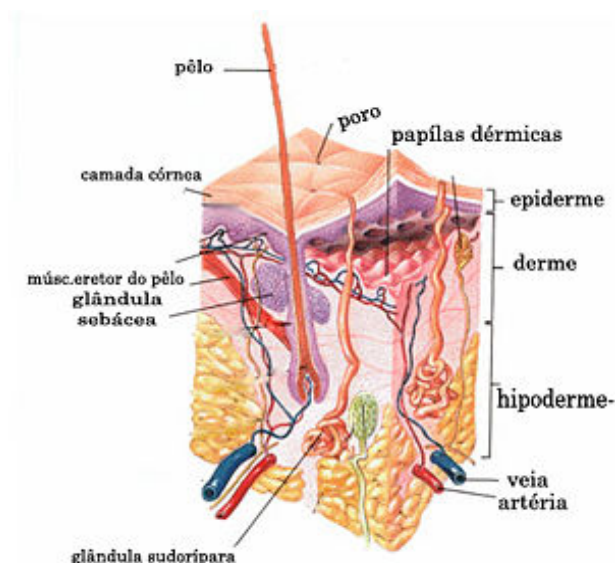


Figura 2.2 – Esquema representativo das várias camadas da pele [23].

Para a grande maioria dos compostos, a principal barreira da penetração química é a camada mais externa da pele, denominada por estrato córneo e portanto esta apresenta relevância directa para a absorção percutânea de agentes terapêuticos. O estrato córneo é constituído maioritariamente por células de queratina (proteína resistente e impermeável responsável pela protecção) empacotadas e insolúveis rodeadas de proteínas reticuladas e de lípidos [22]. Os lípidos são essencialmente ceramidas primárias, colesterol e derivados de ácidos gordos.

Como as outras partes da pele, epiderme e derme, não possuem propriedades de barreira, a capacidade de penetração através do estrato córneo é essencial para a absorção percutânea de agentes terapêuticos. A natureza heterogénea do estrato córneo permite pelo menos três possíveis caminhos para o transporte de drogas para o organismo [21]: caminhos intercelulares que existem entre as células de queratina e que atravessam apenas a fase lipídica, caminhos intracelulares através das células de queratina e dos lípidos e por último caminhos de apêndice que incluem os ductos de suor e os folículos dos pêlos que penetram o estrato córneo e representam 0,1% da superfície total da pele, como se encontra representado na Figura 2.3. De entre estas, considera-se a via intercelular como sendo a via principal de transporte de compostos lipídicos.

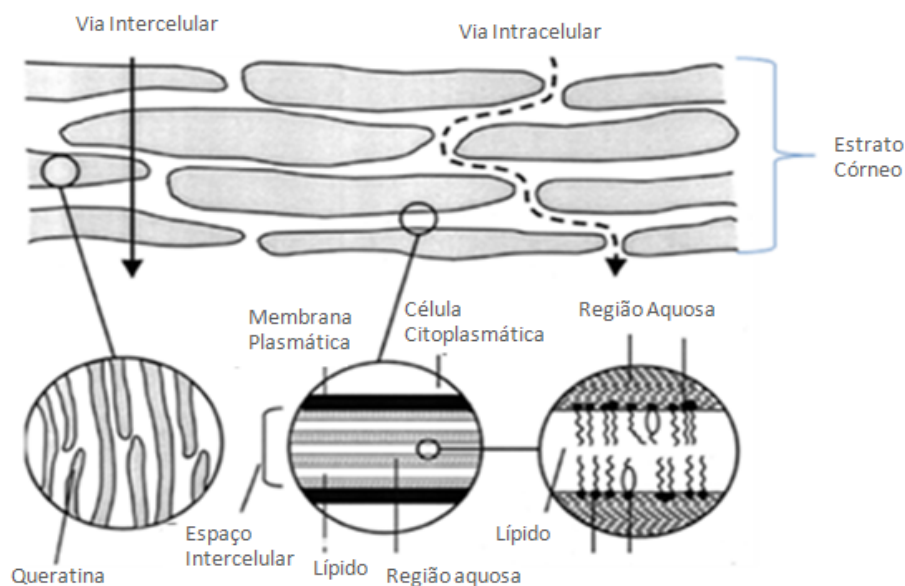


Figura 2.3 – Representação esquemática dos caminhos de transporte de agentes terapêuticos através do estrato córneo [adaptado de 24].

2.2.2. Teoria da Permeação

A grande maioria dos modelos matemáticos sugeridos para o transporte de emulsões através do estrato córneo utiliza equações de difusão unidimensionais sujeitas a uma série de condições de fronteira definidas. A grande popularidade destes métodos deve-se à sua simplicidade matemática. Assume-se que sob condições de estado estacionário, o fluxo é proporcional ao gradiente de concentração através da membrana e que a quantidade total da substância difundida que passa através da membrana é linear em função do tempo [21].

A taxa de migração é medida através do fluxo, J , na matriz da membrana que pode ser definido como a quantidade permeada, Q , que atravessa a área da membrana, A , durante o tempo t [25]:

$$J = \frac{Q}{A t} \quad (2.1)$$

No estado estacionário, o fluxo de uma substância por unidade de área de uma secção é proporcional ao gradiente de concentração medido perpendicularmente à secção, como se pode ver na seguinte equação [25, 26]:

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (2.2)$$

A constante D é denominada por coeficiente de difusão, C é a concentração da substância transferida e x é a coordenada espacial na direcção da difusão. Esta forma da primeira lei de Fick utiliza-se na ausência de convecção na direcção da difusão, e é aplicada a soluções diluídas onde a difusão seja unidireccional.

Ao final de algum tempo é atingido o estado estacionário, onde a concentração em todos os pontos da membrana é constante, situação traduzida por [27]:

$$\frac{d^2C}{dx^2} = 0 \quad (2.3)$$

A equação diferencial apresenta duas condições de fronteira [27, 28]:

$$x = 0, C = KC_1$$

$$x = l, C = KC_2$$

K é o coeficiente de partição, propriedade do equilíbrio da droga entre a superfície da membrana com espessura l e o veículo. Representados por C_1 e C_2 estão as concentrações do gel e do líquido respectivamente, em ambos os lados da membrana.

No estado estacionário, o fluxo da substância que permeia a membrana é igual em toda a secção, e vem dado pela equação [25]:

$$J = \frac{D(C_1 - C_2)}{l} \quad (2.4)$$

Sabendo o fluxo e o gradiente de concentração é possível calcular o coeficiente de permeação, P , pela segunda lei de Fick [29]:

$$J = \frac{AP}{l} (C_1 - C_2) \quad (2.5)$$

Quando é aplicada determinada concentração de gel numa das faces da membrana, antes de ser atingido o estado estacionário, o fluxo e a concentração variam com o tempo em todos os seus pontos. A quantidade total de droga que permeia na solução receptora no tempo t vem dada pela expressão [8, 21, 30, 31]:

$$Q_t = AKlC_1 \left[\frac{Dt}{l^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum \frac{(-1)^n}{n^2} \exp \frac{Dn^2\pi^2 t}{l^2} \right] \quad (2.6)$$

Quando t tende para tempos muito longos, atinge-se o estado estacionário onde o fluxo é constante. Nesta zona, a quantidade de droga permeada Q_t em função do tempo t , apresenta a seguinte expressão [8, 25]:

$$Q_t = \frac{DC_1}{l} \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad (2.7)$$

A extrapolação entre a zona onde se verifica o estado estacionário e o eixo do x , para o valor $Q_t = 0$, corresponde ao tempo de latência θ [8, 25, 31, 32]:

$$\theta = \frac{l^2}{6D} \quad (2.8)$$

O tempo de latência representa o tempo necessário para estabelecer um movimento constante ou seja, o tempo que se demora a obter um gradiente de concentração da permeação constante através da membrana [24, 33]. Ao elaborar um gráfico Q_t/A vs t , como o mostrado na Figura 2.4, para tempos suficientemente grandes, onde se obtém uma resposta linear, pode-se determinar o tempo de latência, θ , e consequentemente o coeficiente de difusão D através da Equação (2.8).

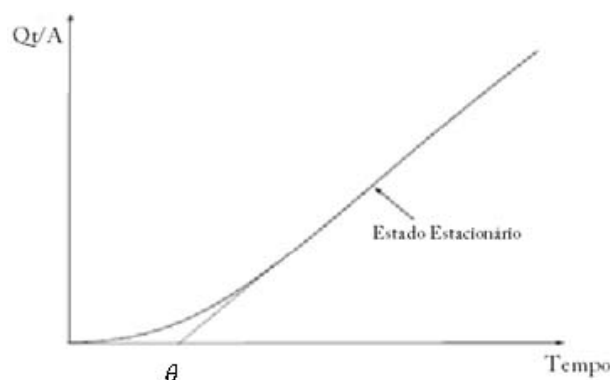


Figura 2.4 - Diagrama típico de medições experimentais de Q_t/A em função do tempo [adaptado de 31].

O coeficiente de permeação P pode ser calculado através da expressão [7, 34, 35, 36]:

$$P = \frac{J}{c_1} \quad (2.9)$$

Onde C_1 é a concentração do gel no compartimento doador. Assume-se que a concentração da droga no compartimento receptor é negligenciável quando comparada com a do compartimento doador [34].

2.3. Técnicas Analíticas utilizadas nos Estudos da Permeação

2.3.1. A Célula de Difusão

Praticamente todos os trabalhos utilizam uma célula de difusão de Franz para o estudo da difusão de drogas de emulsões tópicas comerciais [1]. Para além da substituição periódica de alíquotas da câmara receptora por fluído sem diclofenac, a geometria da célula torna difícil remover as bolhas de ar da interface líquido/membrana o que pode afectar a precisão e exactidão dos dados.

Na Figura 2.5 apresenta-se uma célula de difusão de Franz, que consiste num compartimento doador e noutro receptor, separados pela amostra de pele [31]. A formulação

farmacêutica é colocada na câmara doadora e a difusão do composto em estudo através da pele é medida retirando amostras da câmara receptora a determinados períodos de tempo, que são posteriormente analisadas.

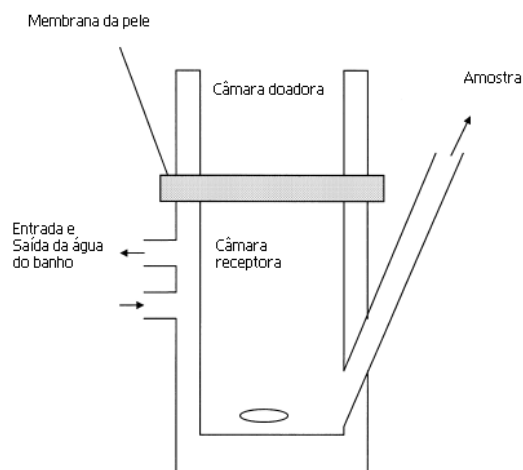


Figura 2.5 – Representação esquemática de uma célula de difusão de Franz utilizada em permeações de compostos através da pele [Adaptado de 31].

2.3.2. Métodos Analíticos

Vários métodos têm sido reportados para a determinação do diclofenac de sódio em preparações farmacêuticas. Entre estes, podem destacar-se técnicas analíticas como a Espectrofotometria *UV-Vis* [37, 38, 39, 40], a Espectroscopia FT-Raman [41], a Calorimetria [42], a Potenciometria [11, 43, 44, 45], o *HPLC* [10, 46, 47] e a Cromatografia Gasosa [48].

2.3.2.1. Espectrofotometria *Uv-Vis*:

Apesar desta ser uma das técnicas mais populares, ela apresenta algumas dificuldades na determinação directa do diclofenac já que muitos interferentes absorvem na mesma região do composto. Para contornar este facto, muitos autores recorreram à formação de complexos de diclofenac que absorvem na zona do visível. São exemplos o trabalho de S. Agatonocić-Krustrin *et al.* [37] no qual foram realizadas reacções colorogénicas com cloreto de ferro (III) na presença de tiocianato de amónio, ou o trabalho de A.A. Martin *et al.* [37] no qual se efectuou uma reacção do diclofenac de sódio com ácido nítrico que resulta numa solução amarelada extractável em acetato de etilo com um máximo de absorvência a 380nm.

Embora exista este problema dos interferentes, este método possui também vantagens como a boa precisão, sensibilidade, simplicidade e custo razoável do equipamento.

2.3.2.2. Espectroscopia de FT-Raman:

Como este método permite a quantificação de misturas complexas, é muitas vezes utilizado na análise de fármacos, desde que o composto que se pretende determinar se encontre em elevado teor no produto. Na maioria das vezes, não é necessário qualquer tratamento adicional [41].

2.3.2.3. Calorimetria Diferencial de Varrimento:

A técnica de DSC foi utilizada por R. Bucci *et al.* [42] para a determinação do diclofenac em fórmulas de Voltaren®, por ser simples de realizar e poder ser concorrente com outros métodos convencionais. A determinação foi feita através da área do pico endotérmico a uma temperatura de 180°C num ambiente de azoto. Contudo, é necessário o pré-tratamento dos produtos comerciais devido à interferência dos excipientes através de uma extracção com ciclohexano.

2.3.2.4. Potenciometria:

Os métodos potenciométricos com eléctrodos de ião selectivo podem providenciar valores bastante exactos para misturas complexas com diclofenac de sódio já que proporcionam a determinação directa de iões em solução com alta selectividade. Estas técnicas são normalmente baratas, simples e rápidas, o que as torna bastante atractivas para ensaios de produtos farmacêuticos. No trabalho de A.O. Santini *et al.* [43] encontra-se descrito um procedimento com a utilização de um eléctrodo de Pt|Hg|Hg₂(DF)₂|grafite, que provou ser um método confiável, selectivo e simples na determinação do diclofenac (DF).

2.3.2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:

O HPLC com detecção por ultravioleta é o método mais comum na quantificação do diclofenac, mesmo exigindo um investimento inicial muito elevado na aquisição do equipamento. Possui alguns problemas como a falta de sensibilidade e a pouca especificidade

o que pode levar a interferência por parte dos metabolitos do diclofenac ou outros compostos endógenos [46, 47, 48]. Este método requer também muitas vezes extracções com múltiplos passos. Apesar disto, e como principais razões para a utilização frequente desta técnica, pode-se destacar a sua adaptabilidade e a sua capacidade de separação de espécies não voláteis ou termicamente instáveis [49].

2.3.2.6. Cromatografia Gasosa:

Este método possui sensibilidade e especificidade adequadas, mas para a sua realização são necessários elevados volumes de amostra, derivatizações demoradas e procedimentos de tratamento prévio da amostra, assim como instrumentação complexa [48].

Apesar de se encontrarem várias técnicas analíticas descritas para os estudos do diclofenac de sódio, são na sua grande maioria muito demoradas e exigem equipamentos muito caros e sofisticados. A maior desvantagem é no entanto não permitirem efectuar os estudos de permeação em tempo real o que leva à alteração das condições em que os mesmos decorrem.

Neste contexto, pode ser adoptado como alternativa um método baseado em sensores de ondas acústicas, uma vez que apresenta uma instrumentação simples, económica, versátil e que permite obter respostas proporcionais à concentração em tempo real. Deste modo e com este trabalho, idealizou-se e desenvolveu-se este método para estudos de permeação através da pele.

2.4. Microbalança de Cristais de Quartzo

2.4.1. Cristais Piezoeléctricos de Quartzo

Os princípios teóricos dos cristais piezoeléctricos datam de 1885, e foram descritos por Raleigh, embora uma primeira investigação tenha sido executada por Jacques e Pierre Curie em 1880 [24, 50].

A piezoelectricidade é a propriedade que alguns materiais apresentam de quando sujeitos a uma compressão desenvolverem entre as superfícies deformadas uma diferença de potencial proporcional à pressão aplicada [51].

De entre os vários cristais piezoelétricos que se podem utilizar, o quartzo α , constituído quimicamente por dióxido de silício (SiO_2) [24], é o mais comum. Este é insolúvel em água, inerte e resiste até temperaturas de 579°C. Quando se aplica um campo eléctrico alternado a um cristal de quartzo gera-se um movimento oscilatório. A razão entre a energia armazenada e a energia perdida, em cada ciclo durante a oscilação, garante a estabilidade da frequência [51].

Embora grande parte das propriedades do cristal de quartzo sejam anisotrópicas, existem algumas que dependem da direcção. O cristal é descrito por um sistema de coordenadas como se mostra na Figura 2.6, onde o eixo z é considerado como o eixo principal de crescimento do cristal [24, 50, 51]. O cristal piezoelétrico de quartzo é obtido pelo corte em determinado ângulo da estrutura cristalina.

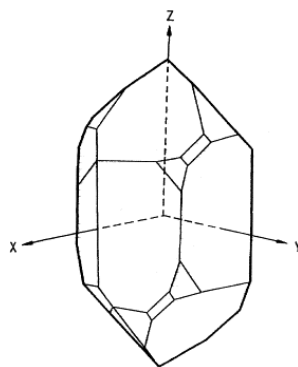


Figura 2.6 – Estrutura cristalina do quartzo com representação dos eixos ordenados [50].

O ângulo escolhido para o corte do cristal faz variar o coeficiente de temperatura [51], descoberta que provocou uma vasta gama de cortes (série “ T ”). Obteve-se assim uma série de cristais com diferentes propriedades para uma vasta gama de aplicações.

Normalmente são utilizados cristais com corte- Y a vibrar no modo de cisalhamento [51]. Estes permitem bons resultados com poucas vibrações interferentes, embora sejam sensíveis a variações externas de temperatura. Foram encontrados dois ângulos para os quais, à temperatura ambiente, o coeficiente de temperatura é zero [24, 50, 51, 52, 53, 54]. São eles o corte AT ($+35^{\circ}15'$) e o corte BT ($-49^{\circ}00'$) em relação ao eixo do cristal primário, como representado na Figura 2.7.

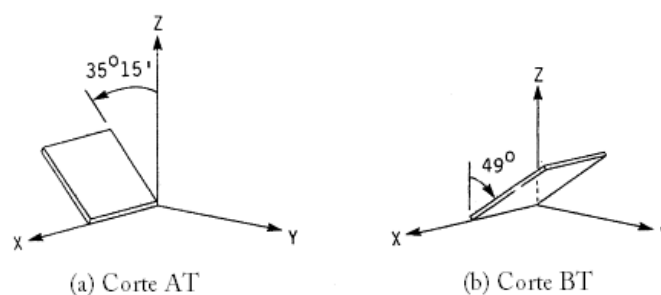


Figura 2.7 – Orientação dos cortes (a) AT e (b) BT [50].

O corte AT, representado na figura anterior é superior ao corte BT no que diz respeito ao coeficiente de temperatura e à sensibilidade à massa [51], sendo deste tipo os cristais utilizados neste trabalho. Para estes, o coeficiente de temperatura é cerca de $1\text{ppm}/^{\circ}\text{C}$ para uma gama entre 10 e 50°C .

À fina lâmina de quartzo são aplicados dois eléctrodos de ouro ou prata, um de cada lado, como representado na Figura 2.8. Estes eléctrodos permitem a indução de um campo eléctrico oscilante perpendicular à superfície, que produz uma oscilação mecânica e provoca uma onda estacionária por todo o cristal.

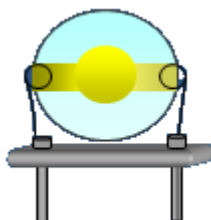


Figura 2.8 – Cristal piezoeléctrico de quartzo.

A microbalança de cristais piezoeléctricos (QCM) baseia-se na variação de massa na superfície do cristal que provoca uma variação na frequência de vibração. Esta é um dispositivo cuja direcção de oscilação predominante é a de cisalhamento, em que as partículas da superfície do cristal se deslocam como se mostra na Figura 2.9. Deste modo, e controlando todas as variáveis que influenciam o cristal, podemos considerar que a espessura é directamente proporcional à frequência.

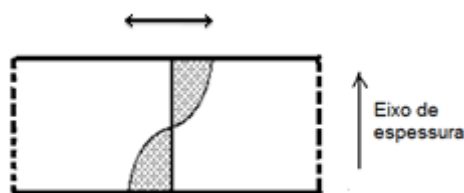


Figura 2.9 - Modo de cisalhamento da espessura para um cristal piezoelétrico de corte AT.

Os cristais podem ser polidos ou não polidos, o que tem influência na aderência [24]. Quando em trabalhos em fase líquida, são recomendados os cristais polidos, uma vez que o líquido pode ficar retido nas cavidades do cristal, levando conseqüentemente a uma alteração de frequência.

O diâmetro do cristal desempenha um papel importante na sua estabilidade. Para os cristais mais utilizados, com frequência de 9,0MHz, os diâmetros encontram-se entre 10 e 16mm [51]. Por outro lado, a espessura do cristal determina a sua frequência, que por sua vez determina a sensibilidade. Quanto mais fino o cristal for, maior é a sua frequência.

2.4.2. Fundamentos Teóricos da QCM

Neste estudo é utilizado o método das microbalanças de cristais de quartzo, que permite a observação da diferença de massa através da variação da frequência de vibração.

Em 1959, Sauerbrey [50, 52, 55] introduziu este novo método que permite medir a massa de filme aderente à superfície do cristal de quartzo, por unidade de área, pela variação da frequência do cristal. O cristal de quartzo permite a obtenção de respostas rápidas e em tempo real, apresentando ainda elevada sensibilidade. Pode detectar massas até $10^{-15}kg$, enquanto as microbalanças analíticas comerciais detectam apenas até aos $10^{-7}kg$ [24, 53]. Assim sendo, para medir massas muito pequenas, a QCM é um instrumento bastante útil em gases e em líquidos.

Para pequenas variações de massa, foi desenvolvida uma relação entre a massa do filme depositado num cristal de quartzo que vibra em modo de cisalhamento de espessura, com a variação da frequência. Sauerbrey [51] propôs a seguinte expressão para a frequência:

$$F = \frac{V_{tr}}{2t} = \frac{N}{e} \quad (2.10)$$

Onde V_{tr} representa a velocidade de propagação de uma onda transversal no plano do cristal, e é a espessura do cristal e N é a constante de frequência que vem dada por $V_{tr}/2$. Através desta equação, pode-se obter uma expressão para a variação da frequência (ΔF), quando a espessura do cristal de quartzo é aumentada numa quantidade diferencial [51]:

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta t}{e} \quad (2.11)$$

Além da espessura do cristal, outros factores como o corte e o diâmetro podem afectar a sua frequência. A variação de frequência resultante da deposição de um filme fino uniforme de qualquer substância é igual à variação resultante de uma camada de quartzo com a mesma massa. Substituindo a forma diferencial da Equação (2.11) numa relação de massa e densidade vem [51]:

$$\frac{\Delta F}{F} = -\frac{\Delta M_f}{ta\rho_q} \quad (2.12)$$

Onde ΔM_f representa a massa do filme de qualquer substância que se encontre a revestir o cristal de quartzo, a é a área activa do cristal e ρ_q é a densidade do quartzo. Se t for substituído por N/F , o valor da constante de frequência (N) para o cristal for $0,167MHz.cm$ e a densidade for $2,649g.cm^{-3}$, obtém-se que [51]:

$$\Delta F = -2,3 \times 10^6 F^2 \frac{\Delta M_f}{a} \quad (2.13)$$

Para um cristal de $9MHz$, a sensibilidade corresponde a $400Hz.\mu g^{-1}$, e o limite de detecção estimado ronda $10^{-15}kg$. Contudo, esta equação apresenta algumas limitações, uma vez que assume que a massa adicionada ou perdida na superfície do oscilador não sofre qualquer deformação de cisalhamento durante a oscilação. Deste modo, a equação de Sauerbrey só pode ser utilizada para razões de massa por unidade de área do filme m_f e do

quartzo m_q não superiores a 0,02 [51], sendo para valores superiores a este necessária uma teoria mais complexa.

Embora a relação de Sauerbrey seja a mais utilizada para as aplicações das microbalanças, é necessário notar que devido às várias simplificações resultantes das deduções, a equação é apenas semi-quantitativa. Outros factores como a fixação mecânica ou a temperatura, afectam também a exactidão absoluta e consequentemente o trabalho quantitativo requer a utilização de curvas de calibração [24, 51].

2.4.3. Sensores Acústicos em Líquidos

Konash e Bastiaans [24, 50, 52, 56] realizaram em 1980 a primeira tentativa de utilizar os cristais de quartzo piezoeléctricos em fase líquida. No seu trabalho, eles desenvolveram um detector de cromatografia líquida onde uma face do cristal ficava exposta ao fluxo do eluente. Embora apresentasse pouca sensibilidade e reprodutibilidade, foi provado que é possível um cristal de quartzo produzir oscilações estáveis num líquido.

No início destes estudos, realizava-se o cálculo da massa através da equação de Sauerbrey. Alguns anos mais tarde, em 1985, Kanazawa e Gordon [24, 50, 52, 54, 55, 58] calcularam a mudança de frequência para a face do cristal em contacto com o líquido. Quando se pretende utilizar a QCM numa fase líquida, esta passa a ser influenciada também pelas propriedades do líquido em questão. Para uma camada de espessura maior, a relação entre a frequência e a massa deixa de ser linear, tal como na equação de Sauerbrey. A oscilação na superfície do cristal gera um escoamento tipo laminar no líquido, o que provoca um decréscimo na frequência proporcional a $(\rho\eta)^{1/2}$, onde ρ e η são a densidade e a viscosidade do líquido, respectivamente [24].

A variação da frequência do cristal em contacto com o líquido pode ser calculada através da expressão de Kanazawa e Gordon [24, 50, 55, 58]:

$$\Delta f = -f_q^{3/2} \left(\frac{\rho\eta}{\pi\rho_q\mu_q} \right)^{1/2} \quad (2.14)$$

Onde ρ_q é a densidade do cristal de quartzo e μ_q é o modo de cisalhamento.

Outros grupos de pesquisa provaram que para além da viscosidade e da densidade do líquido, outros parâmetros como a estrutura da interface sólido/solução, condutividade, polaridade, temperatura, viscosidade interfacial, características hidrofóbicas e hidrofílicas da superfície do cristal e extensão da área do cristal em contacto com a solução, são de grande importância na aplicação de cristais piezoeléctricos em ambientes líquidos [24].

Apesar da utilização de cristais com corte AT, o factor mais crítico no caso dos líquidos é a temperatura, uma vez que a viscosidade e a densidade deste variam significativamente com poucos graus de temperatura.

O cisalhamento do cristal condiciona o movimento do líquido, que gera uma onda e penetra nele, como se encontra representado na Figura 2.10.

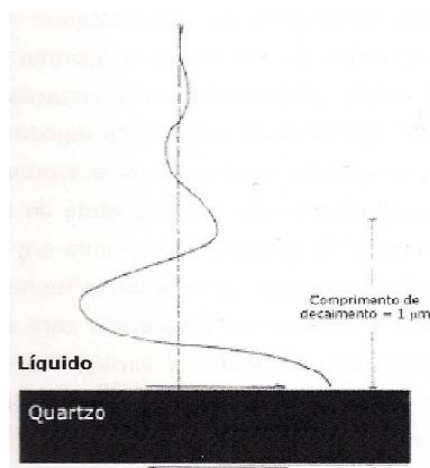


Figura 2.10 - Modo de cisalhamento para o cristal de quartzo em meio líquido [24].

A onda é amortecida pela energia dissipada, consoante as características do líquido, sendo o deslocamento máximo verificado à superfície. O comprimento de decaimento da onda é $1\mu\text{m}$, logo é necessário $1\mu\text{m}$ para que a onda seja amortecida ao penetrar no líquido [24, 59].

2.4.4. Revestimento do Cristal

A espécie a detectar deve interagir com os eléctrodos depositados na superfície do cristal, para que seja possível variar a massa sobre este. Quando esta interacção não existe ou é insuficiente, o cristal deve ser revestido com um filme que permita a adsorção ou a absorção do analito.

A escolha do revestimento a ser utilizado é um dos passos mais importantes no desenvolvimento de um sensor. Deste dependem propriedades como a estabilidade, reversibilidade, tempo de resposta, sensibilidade, reprodutibilidade e selectividade [51]. Para este trabalho, pretende-se que o revestimento do cristal promova a detecção do diclofenac de sódio no líquido.

Diferentes compostos podem ser utilizados nos sensores potenciométricos com a membrana de PVC, capazes de interagir com o composto a ser analisado. Através da pesquisa bibliográfica [13] chegou-se à conclusão que a utilização do ionóforo brometo de hexadecilpiridínio seria a melhor opção uma vez que este produz uma selecção de acordo com a série de Hofmeister ou seja, a selectividade é apenas baseada na lipofilicidade dos aniões [11].

Foi preparado um sensor constituído por policloreto de vinilo (PVC) e brometo de hexadecilpirínio (HDPB), que reage com o diclofenac formando um ião complexo estável insolúvel na água e na solução fosfato. Segundo o trabalho de Shamsipur *et al.* [11], os melhores resultados para a sensibilidade e para a recta de calibração são obtidos com a utilização de 66% do plastificante ftalato de dibutilo (DBP) na presença de 2% do ionóforo HDPB, tendo sido esta a composição da membrana escolhida.

Na Figura 2.11 é mostrado que o potencial se mantém constante para um pH entre 6,0-9,0, o que é ideal para o presente trabalho, em que o pH é 7,4.

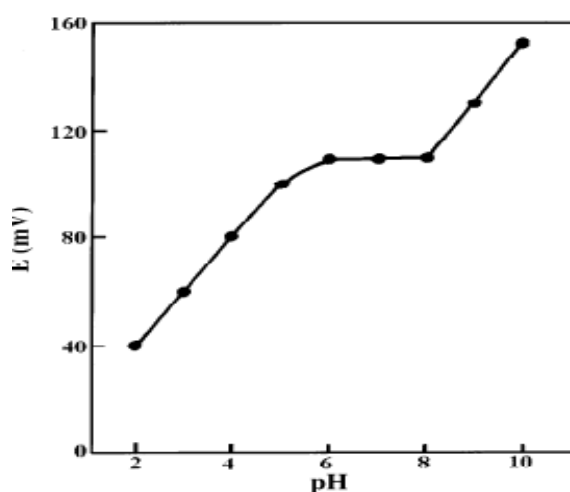


Figura 2.11 - Efeito do pH na resposta do revestimento [11].

3. Instrumentação e Procedimento Experimental

A parte laboratorial deste trabalho está dividida em três componentes. A primeira refere-se ao revestimento do cristal piezoelétrico de quartzo, a segunda aos estudos de permeação de uma solução de diclofenac de sódio e, finalmente a terceira aos estudos de permeação de emulsões comerciais.

3.1. O sensor

3.1.1. Reagentes e Material

Como já foi referido no capítulo anterior, para este trabalho foram utilizados cristais constituídos por quartzo polido e liso de 9MHz com corte AT e por eléctrodos de ouro (ICM – International Crystal Manufacturing). Os cristais tiveram que ser lavados com tetrahidrofurano (THF) antes do revestimento, e posteriormente secos. Registou-se então a frequência do cristal lavado.

O revestimento do cristal deve interagir com a espécie a determinar, neste caso o diclofenac de sódio. Para tal, foi necessária a preparação de uma membrana insolúvel quer na solução tampão quer na água Milli-Q. Esta membrana sensível deveria proporcionar uma resposta rápida, selectividade, sensibilidade e reprodutibilidade adequadas ao sensor. Os reagentes utilizados para a preparação da membrana encontram-se apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados para o revestimento do cristal de quartzo.

Reagentes	Referência
<i>Brometo de hexadecilpiridínio (HDPB)</i>	SIGMA C5881-25G
<i>Policloreto de vinilo (PVC) de alto peso molecular</i>	FLUKA 81392
<i>Ftalato de dibutilo (DBP)</i>	SIGMA-ALDRICH D2270
<i>Tetrahidrofurano (THF)</i>	SIGMA-ALDRICH 33709

3.1.2. Revestimento do Cristal

A preparação do revestimento foi realizada nas mesmas proporções utilizadas no trabalho de Shimsipur *et al.* [11, 24] na preparação de membranas para eléctrodos selectivos. Assim, as quantidades utilizadas foram as seguintes: 32% de *PVC*, 66% de *DBP* e 2% de *HDPB*. Após a pesagem dos reagentes na microbalança (Sartorius M5P) e a medição do volume para o composto líquido, estes foram dissolvidos em THF.

Depois de ser registada a frequência do cristal limpo, foi colocada uma gota do revestimento sobre o eléctrodo de cristal, com a ajuda de uma micropipeta e seguidamente, o cristal foi colocado no “spin coater” (Figura 3.1) a 160rpm durante 1 minuto. Depois de espalhada a gota do revestimento colocou-se o cristal durante 2 dias no excicador, tempo ao final do qual se registou a frequência do cristal com o revestimento.

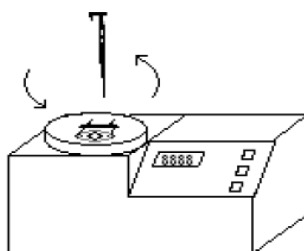


Figura 3.1 – Imagem representativa do spin coater.

Os testes de estudo da sensibilidade do sensor à resposta do diclofenac foram feitos num trabalho anteriormente realizado [24].

3.2. Estudos de Permeação de uma Solução de Diclofenac de Sódio

A montagem e o procedimento experimental necessários à realização dos testes de permeação para a solução de diclofenac de sódio foram desenvolvidos no mesmo trabalho anteriormente realizado no laboratório [24].

3.2.1. Reagentes e Material

Os reagentes utilizados para esta parte do procedimento experimental encontram-se na Tabela 3.2. Quanto à membrana utilizada, optou-se pelo celofane que apresenta uma espessura de $0,023\text{mm}$.

Tabela 3.2 – Reagentes utilizados para os testes de permeação de uma solução de diclofenac de sódio.

Reagentes	Referência
Diclofenac de sódio	SIGMA D6899-10G
Água Milli-Q	

3.2.2. A Montagem Experimental

Para estes testes de permeação, tinha sido construída uma célula de difusão posicionada na horizontal, com uma área de difusão de $1,35\text{cm}^2$ [24]. Na Figura 3.2 pode ver-se um esquema desta célula, onde entre a câmara receptora e doadora foi colocada a membrana de celofane. A câmara receptora foi cheia com 9mL de água Milli-Q e a câmara doadora, onde é injectada a solução de diclofenac de sódio, foi também cheia com 8mL de água Milli-Q.

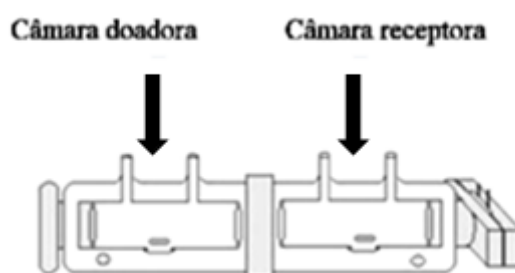


Figura 3.2 – Representação esquemática da célula de difusão horizontal com o sensor piezoelétrico [24].

O cristal piezoelétrico colocado numa célula de PVC foi acoplado à câmara receptora da célula de difusão. Para que a temperatura fosse mantida constante, a $32,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, a célula foi posta numa estufa FRIOCELL. Foram colocados agitadores magnéticos em cada uma das

câmaras, tendo-se mantido uma rotação constante durante as experiências. Para a injeção da solução de diclofenac de sódio foi utilizada uma bureta electrónica (CRISON BURETTE 1S) ligada à câmara doadora da célula de difusão, que permitiu efectuar as injeções sem abrir a estufa. Quanto ao sensor de massa piezoeléctrico, este foi ligado a um oscilador, que por sua vez foi ligado a um frequencímetro (LEADER LF827). Um cabo GPIB fez a ligação ao computador e permitiu a aquisição em tempo real da variação da frequência, através de um programa escrito em LabView 5.1.

3.2.3. Procedimento Experimental

Para a realização dos testes de permeação foi preparada uma solução de diclofenac de sódio de 16165ppm.

Para a calibração, a célula de permeação foi montada sem a membrana de celofane e foram realizadas injeções sucessivas de 50 μ L da solução de diclofenac de sódio até se obterem 6 pontos, o que permitiu construir a recta de calibração.

Para os testes de permeação, as câmaras, doadora e receptora, da célula de difusão cheias de água, foram separadas pela membrana de celofane e foi injectada a solução de diclofenac de sódio (200 μ L) quando a frequência do cristal se tornou estável. Observou-se e registou-se o decréscimo da frequência após nova estabilização do valor.

3.3. Estudos de Permeação para as Emulsões Comerciais

Nesta terceira parte da componente experimental do trabalho, é apresentada a montagem e o procedimento experimental utilizados na realização dos testes de permeação com as emulsões. Foi necessária a montagem do sistema e a construção de uma nova célula de difusão, tendo a montagem evoluído ao longo do tempo, à medida que foram detectados problemas experimentais. Parâmetros como a temperatura, agitação e inexistência de bolhas de ar na solução e principalmente na interface solução/membrana, foram cuidadosa e continuamente controlados.

3.3.1. Reagentes e Material

Para além dos reagentes apresentados na secção anterior, foram utilizados ainda os apresentados na Tabela 3.3, usados para a preparação da solução tampão fosfato 0,05M com pH 7,4. Para a preparação do tampão foi feita uma solução de 15,6g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 500mL e outra de 28,4g de Na_2HPO_4 em 1000mL. De modo a obter um pH de 7,4 foram transferidos 57mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 243mL de Na_2HPO_4 para um volume total de 600mL (Sorensen Buffer) [60].

Tabela 3.3 – Reagentes utilizados na preparação da solução tampão fosfato.

Reagentes	Referência
<i>Di-hidrogeno fosfato de sódio di-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)</i>	PANREAC 121677
<i>Hidrogeno fosfato disódico (Na_2HPO_4)</i>	PANREAC 141679

Foram realizadas experiências com uma membrana sintética, o celofane, e uma membrana natural, a pele humana. O celofane utilizado era um polímero natural derivado da celulose com uma densidade de $32\text{g}/\text{m}^2$ (SADIPAL). A pele, já sem a derme, era proveniente de um cadáver humano de uma mulher de 53 anos e foi mantida congelada a -20°C e retirada para o frigorífico a 3°C quatro dias antes de se realizarem os ensaios. Na Tabela 3.4 encontram-se as espessuras de cada uma destas membranas, medidas com um micrómetro digital (Mitutoyo) cujos valores correspondem à média de um total de cinco medições feitas em diferentes zonas destas.

Tabela 3.4 – Espessuras das membranas utilizadas.

Membrana	Espessura (mm)
<i>Celofane</i>	0,023
<i>Pele Humana</i>	0,046

Quanto às emulsões comerciais utilizadas, optou-se pelo Voltaren Emulgel® e pelo seu genérico, o Diclofenac Gel Cinfa®, cujo componente activo é o diclofenac de sódio. Na Tabela 3.5 listam-se os fabricantes e características como a quantidade de diclofenac de sódio e de água e ainda a densidade do Voltaren Emulgel®.

Tabela 3.5 – Características das emulsões utilizadas.

Emulsão	Fabricante	Quantidade de diclofenac (g/100g de gel)	Quantidade de água (g/100g gel)	Densidade (g/cm ³)
<i>Voltaren Emulgel®</i>	Novartis	1	64,64	0,9499
<i>Diclofenac Gel Cinfa®</i>	Basi	1	78,00	

3.3.2. A Célula de Difusão

Normalmente, e como já foi referido na Secção 2.3.1, utiliza-se para os estudos de permeação da pele uma célula de Franz. A célula de Franz encontra-se normalmente posicionada na vertical e a agitação da solução é feita por uma barra magnética colocada no fundo da câmara receptora, como se pode ver na Figura 2.5. Contudo, no nosso caso, o sensor piezoeléctrico não teria espaço onde ser colocado e para resolver esta questão, foi construída uma célula que se encontra igualmente posicionada na vertical, mas que no fundo da câmara receptora leva o sensor piezoeléctrico. Foi posicionado então, a meio da câmara receptora, um patamar com pequenos orifícios que permitem a passagem da solução e no qual é posicionada a barra magnética. Esta promove a agitação para que a solução seja constantemente homogeneizada, levando a uma temperatura constante e facilitando a difusão. A câmara receptora é termostatzada, o que é possível pela existência de encamisamento.

Quanto à câmara doadora, e como esta é demasiadamente pequena não foi possível a sua termostatização. Esta foi construída em teflon, de modo a encaixar na câmara receptora e permitindo deste modo fixar a membrana de permeação.

Relativamente à célula do cristal, ela foi construída de modo a que uma das faces do cristal ficasse em contacto com a solução tampão, permitindo a detecção do diclofenac de sódio adicionado. Isto foi possível pela construção da parte de cima da célula em teflon, com um orifício que permitisse o encaixe na célula de permeação. A outra face do cristal ficou em contacto com o ar sendo a parte de baixo da célula construída em PVC. Entre os dois lados da célula foi colocado o cristal piezoeléctrico de quartzo, que se manteve fixo pela união com parafusos de uma parte da célula à outra.

Nas Figura 3.3 e 3.4 é possível observar a célula de difusão modificada com o cristal piezoeléctrico.



Figura 3.3 – Célula de permeação modificada com o sensor piezoelétrico.

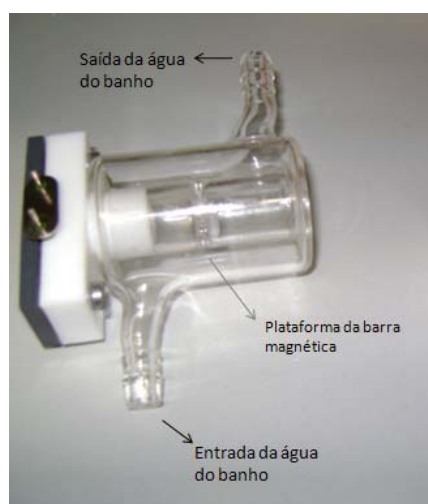


Figura 3.4 – Câmara receptora da célula de permeação modificada.

3.3.3. Montagem da Célula de Permeação

A Figura 3.5 mostra o esquema e a imagem da célula de difusão montada com o sensor piezoelétrico. Na célula de difusão utilizada, a câmara receptora foi construída em vidro e a câmara doadora em teflon, e foi posicionada na vertical com uma área de difusão de $1,35\text{cm}^2$. A câmara doadora e receptora têm uma capacidade $1,5\text{mL}$ e 6mL , respectivamente.

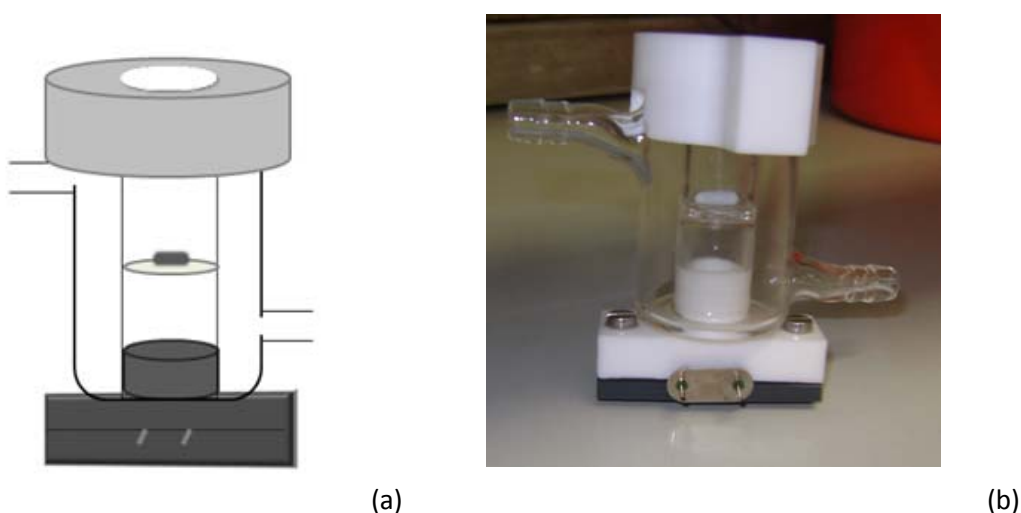


Figura 3.5 – Representação esquemática (a) e imagem (b) da célula de difusão modificada montada.

Entre a câmara receptora e doadora ficou posicionada a membrana para a realização dos testes de permeação, colocada cuidadosamente para não se criarem bolhas na interface entre esta e a solução. Na câmara receptora foi colocada solução tampão fosfato e na câmara doadora foi colocado o gel. A colocação do gel teve também que ser feita cuidadosamente para evitar a formação de bolhas de ar. O cristal piezoelétrico depois de revestido foi colocado numa célula de PVC e esta foi por sua vez acoplada à câmara receptora da célula de difusão.

3.3.4. Requisitos Experimentais

Ao longo do trabalho foram surgindo algumas dificuldades, o que fez com que durante a realização dos ensaios alguma da instrumentação tivesse que ser alterada. A primeira grande dificuldade encontrada foi relativa à agitação. Como grande parte das placas de agitação interferem com a frequência do cristal, levando a grandes variações da mesma, tiveram que ser testadas uma série delas até se conseguir uma em que a frequência permanecesse constante. Devido aos longos tempos de agitação, a placa começou a gerar calor e portanto a célula de difusão teve que ser colocada num suporte universal a uma distância à qual a agitação se realizasse sem problema.

À semelhança do que acontece com a célula de Franz, a nossa célula de permeação foi construída de modo à termostatização se fazer por meio da ligação da camisa exterior a um banho. Como a temperatura é um factor bastante crítico no caso dos líquidos, bastando uma

variação de poucos graus para existirem variações significativas nas suas propriedades, que se traduzem numa variação da frequência e da taxa de permeação, o banho teve que ser colocado o mais perto possível da montagem experimental de forma a minimizar as perdas de calor no percurso do banho até à célula. Devido à pressão exercida pela passagem da água na célula, verificou-se que o suporte universal não era suficiente para manter a célula fixa, tendo sido necessário apoiar a montagem em cima de uma grelha. As mangueiras ligadas ao banho tiveram também que ser fixas por suportes universais, de modo a não tocarem na bancada, evitando assim as vibrações produzidas pela passagem da água. Mesmo depois de todos estes cuidados, verificou-se que a frequência aumentava significativamente ao longo do tempo, o que se provou mais tarde dever-se à evaporação do líquido da câmara receptora, tendo-se optado por cobrir a entrada da célula com Parafilme.

3.3.5. Arranjo Experimental

Depois de todas as alterações para a resolução dos problemas mencionados na secção anterior, adoptou-se a montagem experimental esquematizada na Figura 3.6.

A célula de difusão foi colocada em cima da grelha e fixa com um suporte universal, sendo também a esta ligadas as mangueiras do banho que permitiram a passagem da água. Estas mangueiras foram também elevadas por suportes universais de modo a não tocarem na bancada. O agitador foi colocado no patamar existente na câmara receptora da célula de difusão e a placa de agitação (IKA RH basic2) foi colocada por debaixo da grelha de modo a se conseguir uma boa agitação da solução, a uma velocidade de 70 *rpm*. O trabalho foi realizado a 32,0 °C, pela programação do banho (Selecta Tectron 3473100) para esta temperatura.

As entradas da célula de difusão foram tapadas com uma película de Parafilme para evitar a evaporação da solução.

O sensor piezoeléctrico acoplado à célula foi ligado a um frequencímetro (LEADER LF827). A informação obtida no frequencímetro foi adquirida num computador com o auxílio do programa escrito em LabView 5.1.

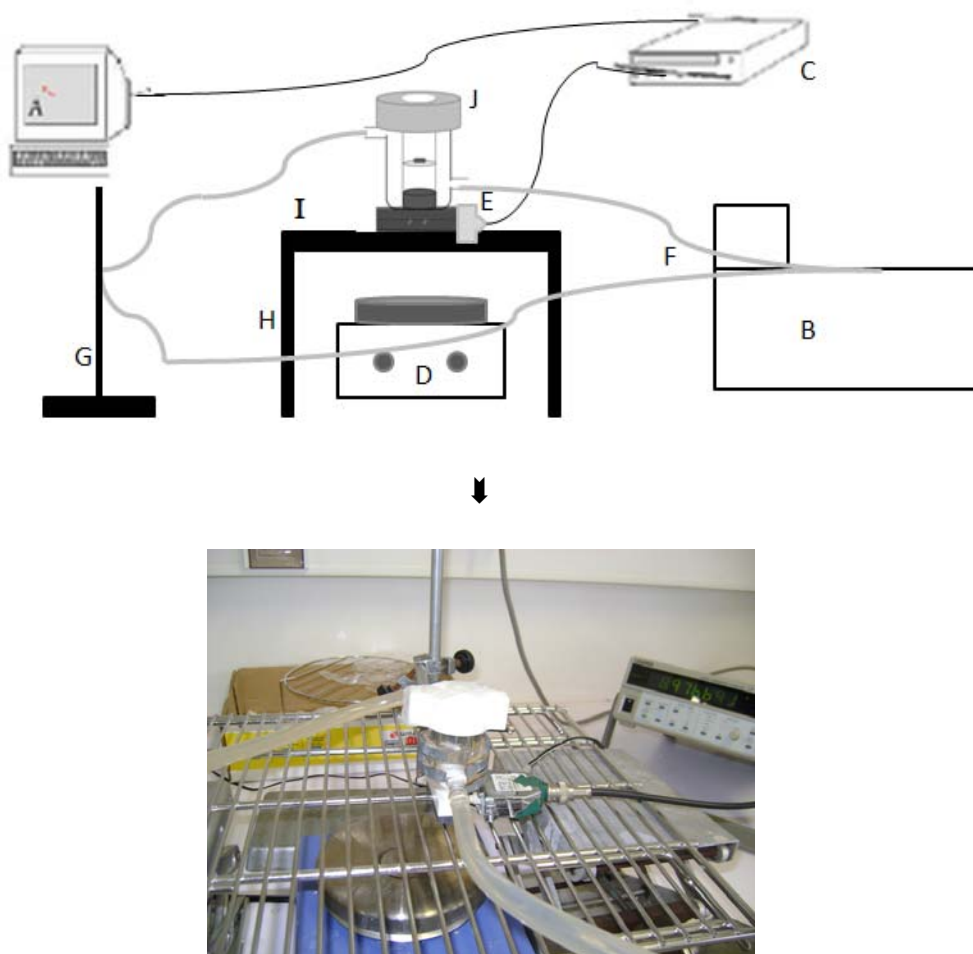


Figura 3.6 – Montagem experimental utilizada nos ensaios de permeação das emulsões: A) Computador; B) Banho Termostático; C) Frequencímetro; D) Placa de Agitação; E) Oscilador; F) Mangueiras; G) Suporte Universal; H) Elevadores; I) Grelha; J) Célula de Difusão.

3.3.6. Procedimento Experimental

3.3.6.1. Calibração

A célula de difusão foi montada sem a membrana a separar a câmara doadora da câmara receptora. A câmara receptora foi cheia com 6,00mL da solução tampão fosfato 0,05M. A câmara doadora foi coberta com Parafilme e ligou-se a placa de agitação de modo a obter uma boa rotação da barra magnética, a uma velocidade de 70 rpm. O banho estava programado para uma temperatura de 32,0 °C.

Iniciou-se o programa de aquisição de frequência e os dados começaram a ser armazenados. Depois da frequência se encontrar estável adicionou-se, com uma micropipeta,

45 μ L de uma solução de concentração rigorosa \approx 7000ppm de diclofenac de sódio. Observou-se um decréscimo da frequência, consequência da adição de diclofenac e quando a frequência estabilizou calculou-se o valor da sua variação. Realizaram-se novas adições de igual volume da solução de diclofenac de modo a obter 6 pontos para a recta de calibração (ΔF vs. Concentração de diclofenac na câmara receptora).

3.3.6.2. Permeação

Encheu-se a câmara receptora com 6,00mL de solução tampão fosfato 0,05M e preparou-se a célula de difusão com a membrana de celofane ou com a membrana de pele humana, consoante o ensaio pretendido. De notar que aquando dos ensaios com a pele, esta foi colocada com a parte do estrato córneo virada para a câmara doadora e com a epiderme virada para a câmara receptora.

A câmara doadora foi cheia com \approx 2g de pomada pesados com rigor (Voltaren Emulgel® ou Diclofenac Gel Cinfa®). Regulou-se a velocidade de agitação para 70rpm.

Registou-se a frequência inicial à qual o sensor piezoeléctrico de quartzo estabilizou. A frequência continuou a ser monitorizada e os dados armazenados até que, após um período de diminuição, a frequência voltou a estabilizar. Depois da estabilização, desmontou-se a célula de difusão e lavou-se com água destilada, assim como o cristal de quartzo. Secou-se bem e voltou-se a montar a célula para realização de novo ensaio de permeação.

3.3.7. Avaliação de possíveis Interferências provenientes dos Ingredientes das Emulsões

Como para além do diclofenac de sódio, as emulsões apresentam diversos compostos, foi necessário saber se o nosso sensor respondia também a estes compostos. Para tal, e como as percentagens de cada um dos constituintes é desconhecida, optou-se por estudá-los em conjunto.

O cristal revestido foi colocado numa célula de PVC sem acoplamento à célula de difusão, com volume de 1,00mL, onde apenas uma das faces ficou em contacto com o líquido e a célula foi apertada com parafusos de modo a que a solução não vertesse.

A célula foi cheia com solução tampão fosfato 0,05M (1,00mL) e as amostras foram adicionadas com uma micropipeta. Para determinar se o revestimento do cristal respondia a

mais algum excipiente para além do diclofenac de sódio foram, numa primeira fase adicionados volumes conhecidos de uma solução padrão de diclofenac de sódio, e foram registadas as variações de frequência de modo a construir uma recta de calibração.

Seguidamente, foi preparada uma solução com o gel em questão, segundo o procedimento sugerido por Y. Bazel *et al.* [12] no qual o gel é dissolvido em etanol (Tabela 3.6). Adicionou-se um volume de $15\mu\text{L}$ da solução ao tampão para que a concentração de diclofenac na célula fosse próxima do centróide da recta de calibração. O objectivo era verificar se as respostas correspondentes à mesma concentração obtidas com o gel e com a solução padrão de diclofenac eram iguais. Se tal acontecesse poder-se-ia garantir que não estávamos a detectar os restantes componentes do gel.

Tabela 3.6 – Reagente utilizado na preparação da solução da emulsão.

Reagente	Referência
<i>Etanol</i>	Riedel – de Haën 32221

3.3.7.1. Procedimento

Começou-se por preparar uma solução padrão de diclofenac de sódio com $\approx 7000\text{ppm}$. Após a frequência estabilizada e de registado o valor de frequência inicial, foram adicionados $3\mu\text{L}$ da solução padrão de diclofenac e observou-se o decréscimo na frequência anotando-se o valor da diferença obtida. Repetiu-se este passo algumas vezes, de modo a ser possível obter pontos suficientes para a construção de uma recta de calibração.

Para a preparação da solução com o gel, dissolveram-se 3g deste em 2 mL de etanol e adicionou-se solução tampão fosfato de modo a perfazer uma solução de 5 mL . Adicionou-se depois na célula de PVC do cristal um volume correspondente à concentração do centróide da recta de calibração ($15\mu\text{L}$).

4. Tratamento dos Dados e Discussão

4.1. Testes de Permeação de uma Solução de Diclofenac de Sódio

Na realização dos testes de permeação, são efectuados estudos que permitem determinar o coeficiente de difusão e o fluxo.

Para a sua realização foi utilizada uma membrana de celofane e foram testadas três soluções com concentrações diferentes.

No trabalho realizado anteriormente por C. Oliveira [24] foram testadas duas concentrações diferentes de diclofenac na câmara doadora, 141,1mg/L e 219,1mg/L. Neste trabalho complementou-se o estudo pela utilização de uma concentração maior, 400,2mg/L.

Antes da membrana de celofane ser colocada a separar a câmara doadora da câmara receptora da célula de difusão, foi realizada uma calibração. Montou-se a célula de difusão segundo o procedimento descrito na Secção 3.2.3, e foram realizadas 6 injeções sucessivas de 50µL de uma solução de 16125ppm de diclofenac de sódio.

Na Tabela 4.1. apresentam-se os valores obtidos antes e depois de cada injeção, bem como o volume total de diclofenac de sódio acumulado, a variação total da frequência e a concentração de diclofenac na câmara receptora.

Tabela 4.1 – Valores obtidos da concentração e da variação da frequência para a calibração dos testes de permeação para soluções de diclofenac de sódio.

$V_{\text{acumulado}}$ (µL)	C (ppm)	F_i	F_f	$\Delta F_{\text{acumulado}}$
50	56,47	8987281	8987274	7
100	112,94	8987276	8987268	15
150	169,41	8987271	8987263	23
200	225,88	8987265	8987259	29
250	282,35	8987261	8987253	37
300	338,82	8987255	8987248	44

A partir dos valores da tabela anterior, foi possível representar graficamente a variação da frequência acumulada em função da concentração. Obteve-se assim uma recta de calibração como se pode ver no gráfico da Figura 4.1.

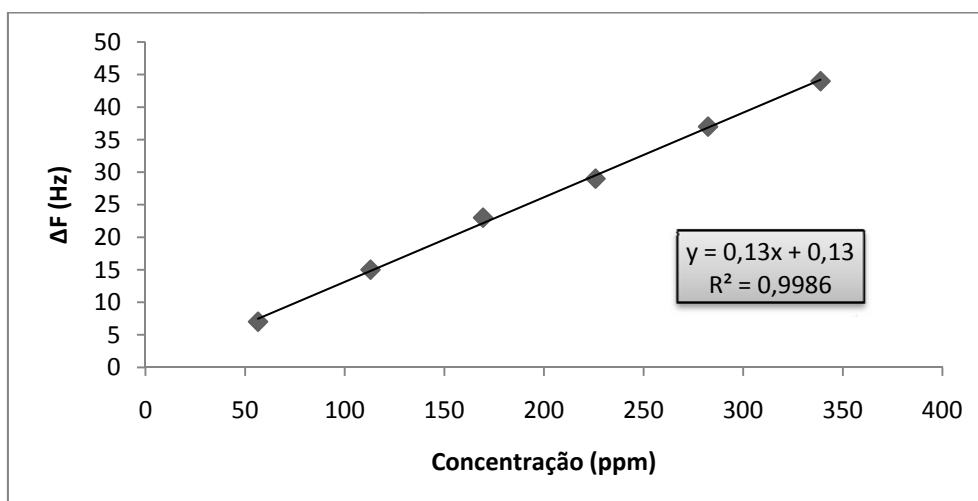


Figura 4.1 – Gráfico da recta de calibração para as permeações da solução de diclofenac de sódio.

Para cada réplica dos ensaios de permeação da concentração de 400,2mg/L foi construída uma recta de calibração. Os valores das equações das rectas de calibração e respectivo coeficiente de correlação encontram-se na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Equações das rectas de calibração e respectivo coeficiente de correlação para as permeações da solução de diclofenac de sódio.

Ensaio	Equação da recta	Coeficiente de correlação
1	$y=0,11x-1,80$	0,9984
2	$y=0,25x-1,93$	0,9985
3	$y=0,13x+0,13$	0,9986
4	$y=0,11x-0,47$	0,9906
5	$y=0,12x-0,45$	0,9912

Depois de calibrar o sensor, a célula de difusão foi montada para a realização dos testes de permeação da solução de diclofenac de sódio. Para tal, foi colocada uma membrana de celofane a separar os compartimentos doador e receptor da célula colocada na horizontal como a mostra a Figura 3.2.

No gráfico da Figura 4.2 encontra-se a resposta do sensor durante o tempo de permeação após serem injectados 200μL da solução de diclofenac de sódio na câmara doadora.

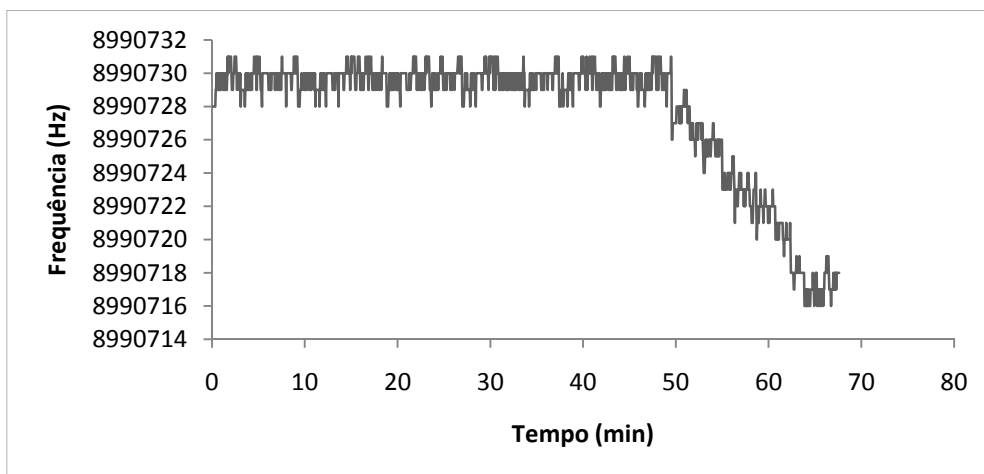


Figura 4.2 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação de uma solução de diclofenac de sódio.

Observando o gráfico, verifica-se que ao final de algum tempo a frequência começava a diminuir até atingir de novo estabilidade. Pelos valores de frequência obtidos durante o ensaio de permeação (Figura 4.2) e utilizando a equação da recta de calibração, obteve-se o gráfico representado na Figura 4.3. Este mostra a concentração de diclofenac de sódio que passou através da membrana para a câmara receptora em função do tempo.

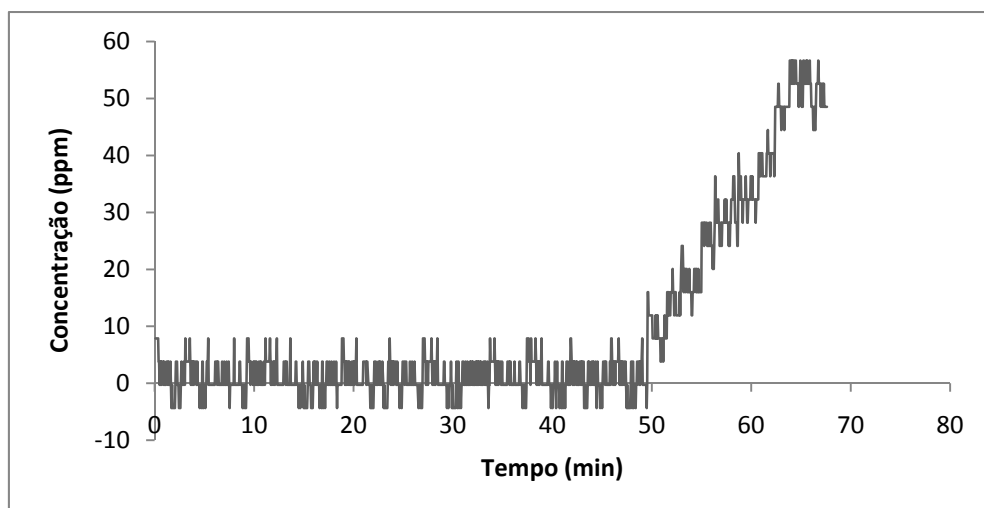


Figura 4.3 – Gráfico da concentração em função do tempo para a permeação de uma solução de diclofenac de sódio, com 400 μ L colocados na câmara doadora.

Analisando o gráfico da Figura 4.3, verifica-se que durante o período de latência a concentração da solução de diclofenac de sódio na câmara receptora varia muito pouco.

Posteriormente o fluxo de diclofenac aumenta gradualmente até atingir o estado estacionário, zona onde a concentração na câmara receptora aumenta linearmente ao longo do tempo. Depois deste período atinge-se uma concentração de equilíbrio.

Com os valores obtidos para a concentração, calculou-se a quantidade permeada (Q_t), que foi posteriormente dividida pela área da membrana (A). Elaborou-se um gráfico (Q_t/A) em função do tempo, como se mostra na Figura 4.4.

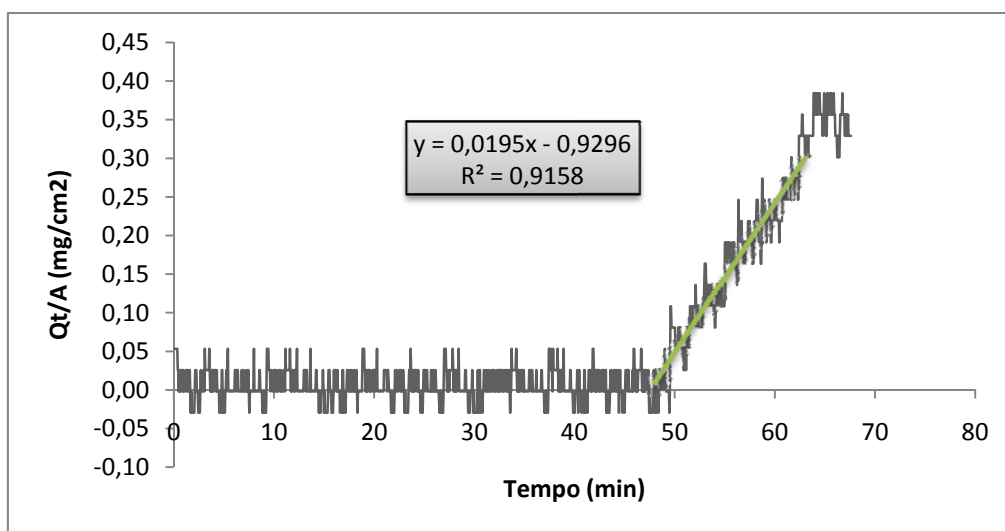


Figura 4.4 – Gráfico da quantidade permeada em função do tempo.

Na zona de estado estacionário, onde o fluxo é constante, é possível traçar uma recta. Esta permite a utilização do método de *time-lag*, obtendo-se um valor para o coeficiente de difusão, através da Equação 2.8, que se encontra na secção 2.2.2.

O tempo de latência foi determinado pela extrapolação da recta da Figura 4.4 para o valor $Q_t = 0$. O fluxo foi determinado pelo declive da recta da zona estacionária.

Na Tabela 4.3 encontram-se os valores obtidos para os tempos de latência, coeficientes de difusão e fluxo, para as várias réplicas. Para além dos ensaios de $400,2\text{mg}/\text{L}$ de diclofenac de sódio, encontram-se também na tabela os valores para as concentrações de $141,1\text{mg}/\text{L}$ e $219,1\text{mg}/\text{L}$ obtidos no trabalho realizado anteriormente [24].

Tabela 4.3 – Valores obtidos para o tempo de latência, coeficiente de difusão e fluxo para as várias concentrações da solução de diclofenac de sódio.

Concentração (mg/L)								
147,1			219,1			400,2		
θ (min)	D (10^{-8} cm ² /min)	J (10^{-2} mg/cm ² .min)	θ (min)	D (10^{-8} cm ² /min)	J (10^{-2} mg/cm ² .min)	θ (min)	D (10^{-8} cm ² /min)	J (10^{-2} mg/cm ² .min)
52,267	1,686	0,36±0,02	46,967	1,878	1,80±0,01	53,952	1,634	1,460±0,001
53,517	1,650	0,24±0,04	49,083	1,794	1,20±0,16	47,672	1,849	1,950±0,002
49,950	1,764	0,30±0,01	48,883	1,806	0,60±0,05	51,476	1,713	1,303±0,001
51,333	1,716	0,42±0,01	54,450	1,620	0,60±0,02	53,024	1,663	1,380±0,001
						47,085	1,872	1,290±0,001

De modo a provar a não dependência do coeficiente de difusão com a concentração, as experiências foram realizadas com diferentes concentrações da solução de diclofenac de sódio na câmara doadora. Observando os valores representados na Tabela 4.3 podemos verificar que os coeficientes de difusão obtidos com as diferentes concentrações são muito semelhantes. De facto, comparando os valores do coeficiente de difusão obtidos para as várias concentrações, através de um teste de Tukey, verificou-se que não existem diferenças significativas entre eles ($\alpha=0,05$). Prova-se assim que o coeficiente de difusão é independente da concentração.

4.2. Testes de Permeação para Emulsões Comerciais

Nesta parte experimental do trabalho, foram utilizados dois géis adquiridos na farmácia local: Voltaren Emulgel® e Diclofenac Gel Cinfa®. Foram também testadas duas membranas diferentes: celofane e pele humana.

O tratamento matemático seguiu também aqui o método de *time lag*, como já demonstrado na secção anterior, para a obtenção dos valores de tempo de latência e coeficiente de difusão.

Para estes ensaios de permeação foi utilizada uma célula de difusão colocada na vertical como mostra a Figura 3.5, na qual a câmara receptora foi cheia com o a solução tampão fosfato e a câmara doadora com o gel.

4.2.1. A Calibração

O procedimento para a realização dos testes de calibração ao sensor encontra-se descrito na Secção 3.3.6. Neste, a célula foi preparada sem a membrana a separar os compartimentos. O compartimento receptor foi cheio com a solução tampão fosfato, enquanto a câmara doadora permaneceu vazia.

Foram feitas 6 injeções sucessivas de $45\mu\text{L}$ de uma solução padrão de diclofenac de sódio $\approx 7000\text{ppm}$. Na Tabela 4.4 encontram-se os valores obtidos da frequência, assim como o volume total de diclofenac acumulado e a concentração deste composto na câmara receptora para uma das calibrações realizadas.

Tabela 4.4 – Valores obtidos da concentração e da variação da frequência para a calibração dos testes de permeação para as emulsões comerciais.

$V_{\text{acumulado}} (\mu\text{L})$	$C (\text{ppm})$	F_i	F_f	$\Delta F_{\text{acumulado}}$
45	52,44	8986889	8986867	22
90	104,89	8986869	8986845	46
135	157,34	8986848	8986827	67
180	209,78	8986830	8986809	88
225	262,23	8986811	8986790	111
270	314,67	8986793	8986772	132

Através destes valores, obteve-se uma recta de calibração da variação da frequência acumulada vs concentração, como a mostrada no gráfico da Figura 4.5.

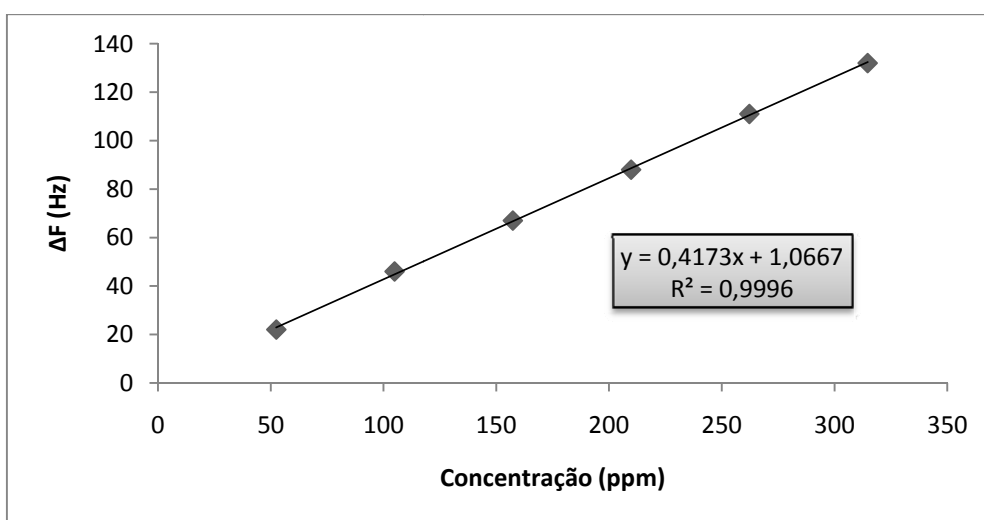


Figura 4.5 – Gráfico da recta de calibração para as permeações das emulsões comerciais.

Como para cada ensaio de permeação foi necessário realizar este passo, os valores das equações das rectas de calibração e os coeficientes de correlação encontram-se sumarizados na Tabela 4.5.

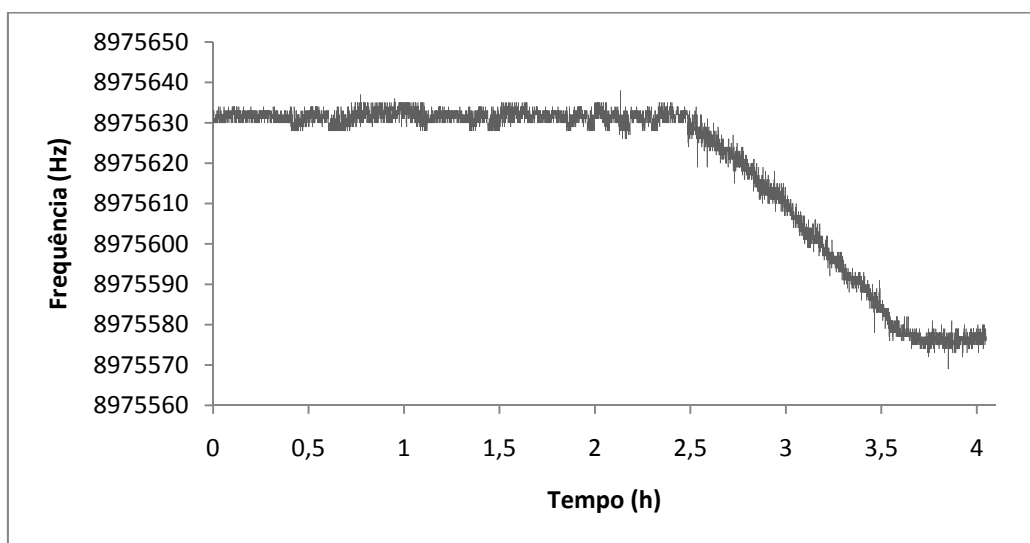
Tabela 4.5 - Equações das rectas de calibração e respectivo coeficiente de correlação para as permeações das emulsões comerciais de diclofenac.

Ensaio	Equação da recta	Coeficiente de correlação
1	$y=0,417x+1,066$	0,9996
2	$y=0,479x-3,333$	0,9992
3	$y=0,460x-0,266$	0,9993
4	$y=0,446x+0,600$	0,9992
5	$y=0,465x-1,733$	0,9986
6	$y=0,454x+0,867$	0,9990
7	$y=0,466x-3,267$	0,9995
8	$y=0,470x-0,467$	0,9993
9	$y=0,472x-0,867$	0,9988
10	$y=0,465x+0,933$	0,9990
11	$y=0,461x-0,267$	0,9993
12	$y=0,470x-0,467$	0,9993
13	$y=0,463x-0,199$	0,9991
14	$y=0,459x+0,675$	0,9989

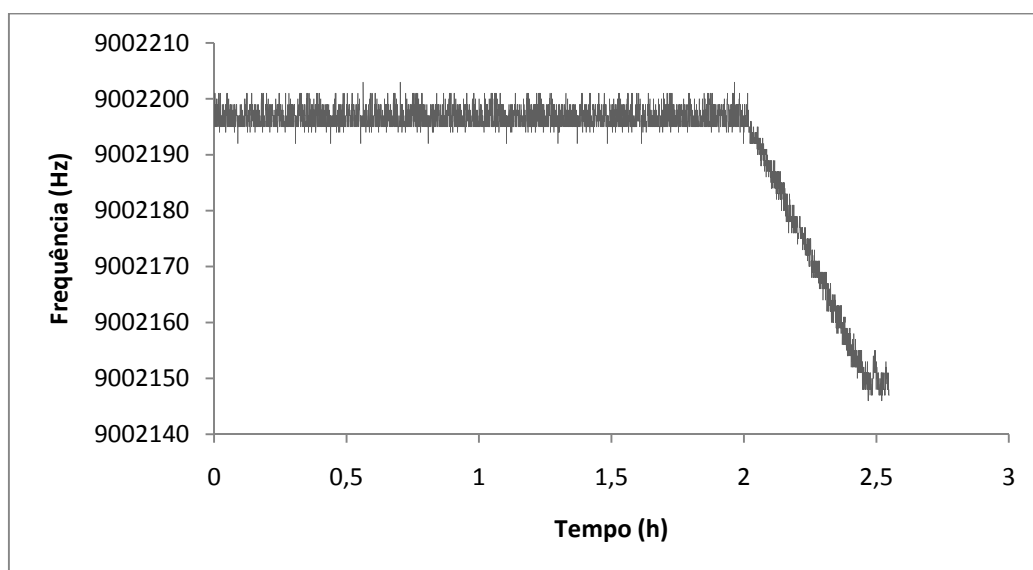
4.2.2. Testes de Permeação através duma Membrana de Celofane

Para a membrana de celofane foram testados ambos os géis: Voltaren Emulgel® e Diclofenac Gel Cinfa®. Depois de montada a célula de difusão com a membrana a separar os compartimentos, doador e receptor, e de realizada a calibração efectuaram-se os ensaios de permeação.

Os gráficos da Figura 4.6 (a) e (b) representam a resposta do sensor ao longo da permeação, para ambos os géis. Estes gráficos foram obtidos depois de serem colocados 2g do respectivo gel na câmara doadora da célula de difusão.



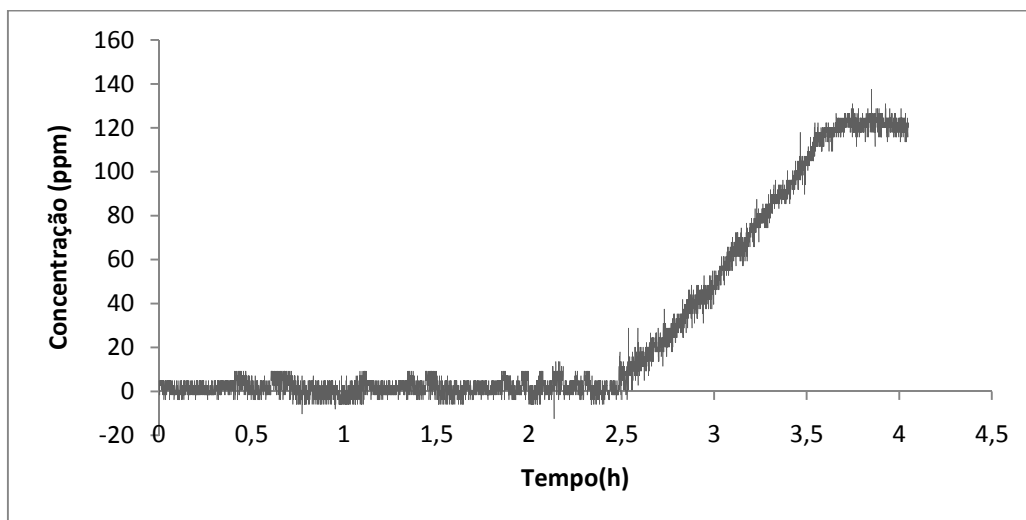
(a) Voltaren Emulgel®



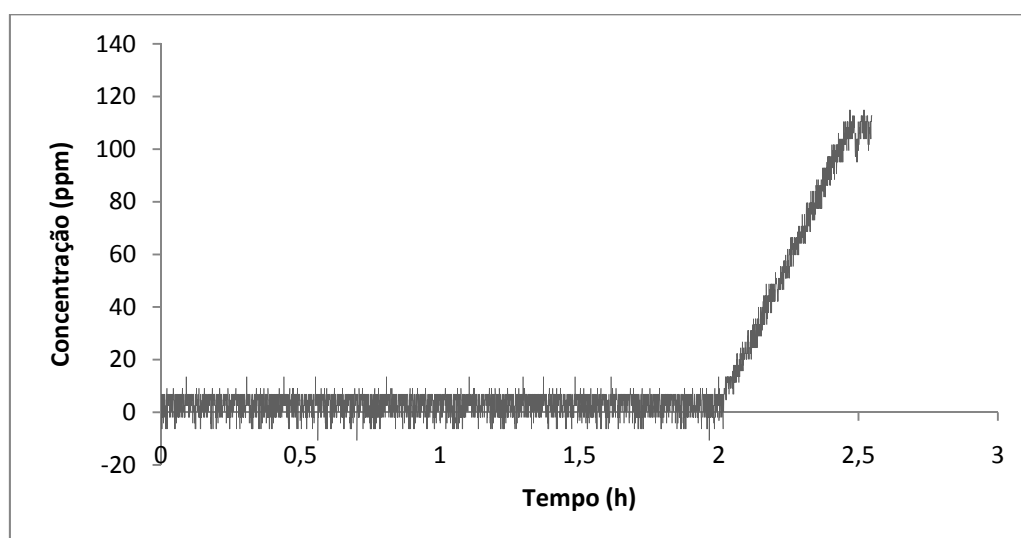
(b) Diclofenac Gel Cinfa®

Figura 4.6 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação para o (a) Voltaren Emulgel® e (b) Diclofenac Gel Cinfa®.

Através dos valores de frequência obtidos e com a equação da recta de calibração, podem ser construídos gráficos da concentração de diclofenac de sódio que passa através da membrana em função do tempo. Estes gráficos encontram-se representados na Figura 4.7.



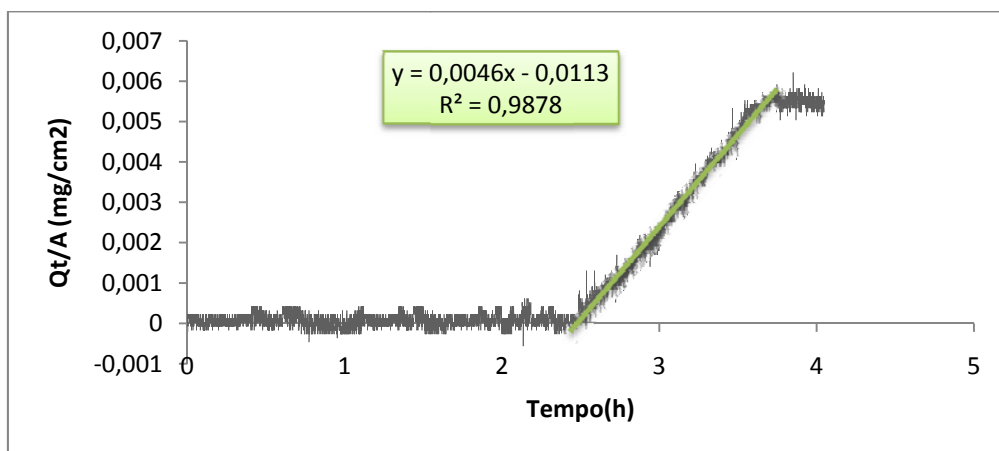
(a) Voltaren Emulgel®



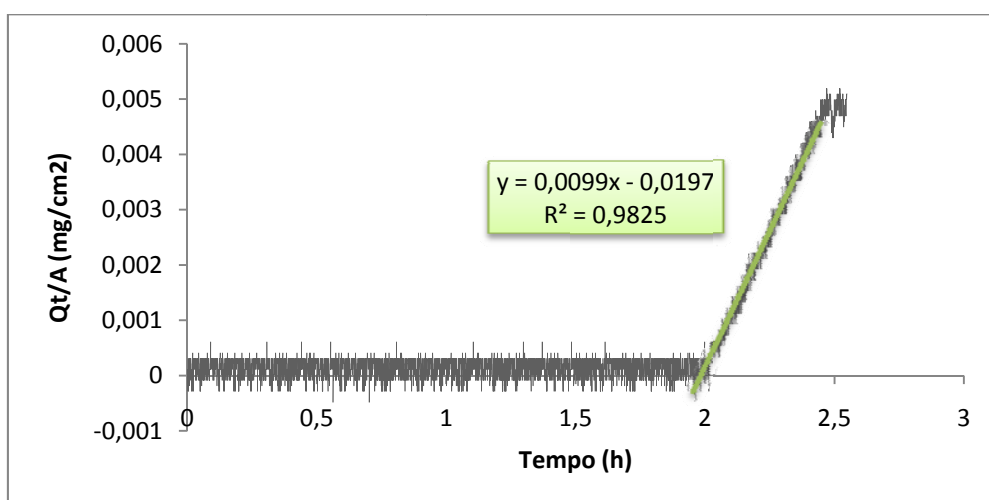
(a) Diclofenac Gel Cinfa®

Figura 4.7 – Gráfico da concentração de diclofenac em função do tempo para a permeação das emulsões comerciais (a) Voltaren Emulgel® e (b) Diclofenac Gel Cinfa®.

Do mesmo modo que aconteceu na Secção 4.1, os valores obtidos para a concentração permitiram calcular a quantidade permeada, que posteriormente foi representada graficamente por Q_t/A em função do tempo. Na Figura 4.8 podem ser vistos estes gráficos para ambas as emulsões comerciais.



(a) Voltaren Emulgel®



(a) Diclofenac Gel Cinfa®

Figura 4.8 – Gráficos da quantidade permeada em função do tempo para os géis (a) Voltaren Emulgel® e (b) Diclofenac Gel Cinfa®.

Através das equações da recta na zona do estado estacionário calculou-se o tempo de latência, o fluxo e o coeficiente de difusão. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Valores obtidos para o tempo de latência, coeficiente de difusão e fluxo das emulsões comerciais.

Voltaren Emulgel			Diclofenac Gel Cinfa		
θ (h)	D (10^{-7} cm ² /h)	J (10^{-3} mg/cm ² .h)	θ (h)	D (10^{-7} cm ² /h)	J (10^{-3} mg/cm ² .h)
2,432	3,353	4,437±0,001	1,928	4,572	9,310±0,009
2,302	3,830	4,194±0,002	1,985	4,442	9,916±0,007
2,482	3,552	4,569±0,002	1,932	4,564	9,792±0,008
2,448	3,602	4,204±0,001	1,905	4,629	9,952±0,007
2,336	3,774	4,431±0,001	1,977	4,459	9,303±0,008

Podemos observar que quer para o coeficiente de difusão quer para o fluxo, os valores obtidos são superiores para o Diclofenac Gel Cinfa. Para as diferenças na permeação contribuem os ingredientes dos géis, muitos deles usados como potenciadores da permeação [19, 60]. Na Tabela 4.7 podem ser vistos os componentes de cada uma das emulsões.

Tabela 4.7 – Componentes constituintes das emulsões comerciais.

Voltaren Emulgel	Diclofenac Gel Cinfa
Água (64,64%)	Água (78%)
Polímero de ácido acrílico (carbopol 934P)	Propilparabeno (E216)
Cetomacrogol 1000	Hidróxido de sódio
Ácido caprílico/éster do álcool do ácido cáprico gordo	Hidroxietilcelulose
Dietilamina	Carbómero
Isopropanol	Triglicéridos de cadeia média
Perfume creme 45	Metilparabeno (E218)
Propilenoglicol	Propilenoglicol
Parafina líquida	

O papel desempenhado na permeação por alguns destes componentes encontra-se descrito na Secção 2.1.3. Torna-se difícil aqui explicar claramente as razões da maior permeação do Diclofenac Gel Cinfa®, porque não se conhecem as quantidades dos compostos presentes nas emulsões, nem há estudos que possibilitem a comparação entre o factor de potenciação conseguido com os mesmos.

Comparando os resultados obtidos para a solução de diclofenac de sódio com os dos géis, podemos verificar que o tempo de latência destes últimos é muito maior. Isto porque, o diclofenac se encontra em emulsão com outros componentes. Também o fluxo de diclofenac das emulsões é muito menor do que o que se observou para as soluções. Contudo, depois do estado estacionário ser atingido a quantidade de diclofenac permeada é maior para o caso dos

géis, provavelmente devido a todos os ingredientes presentes no gel que têm como função facilitar a permeação.

4.2.3. Testes de Permeação através da Pele Humana

Devido à pouca quantidade de pele só nos foi possível testar um dos géis. Escolheu-se o Voltaren Emulgel® por ser o mais estudado na literatura.

O tratamento matemático foi já discutido anteriormente, e nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11 podemos ver os gráficos correspondentes à frequência, concentração e quantidade permeada, todos eles em função do tempo.

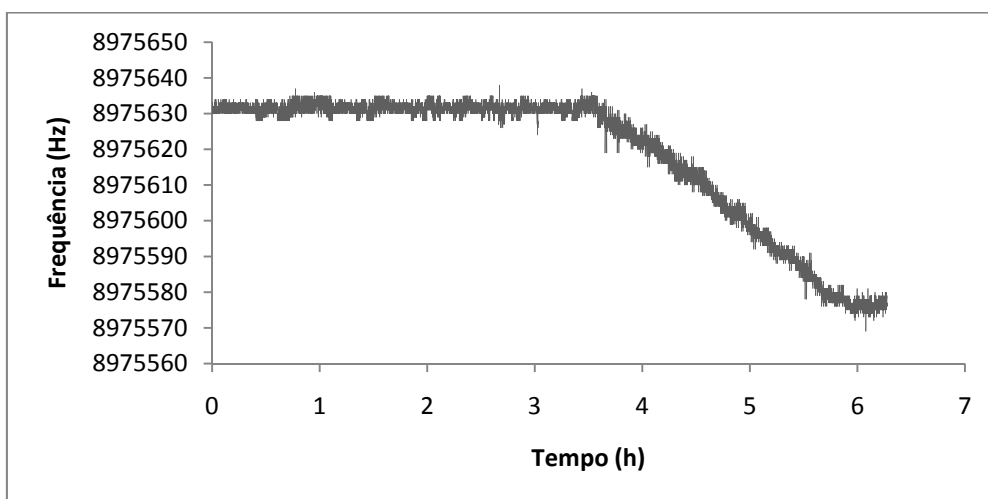


Figura 4.9 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação através da pele humana.

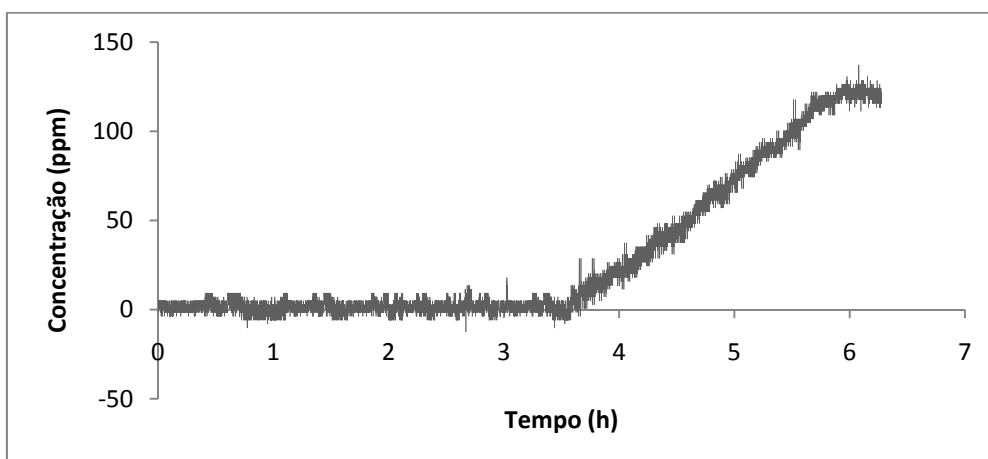


Figura 4.10 – Gráfico da concentração de diclofenac em função do tempo para a permeação através da pele humana.

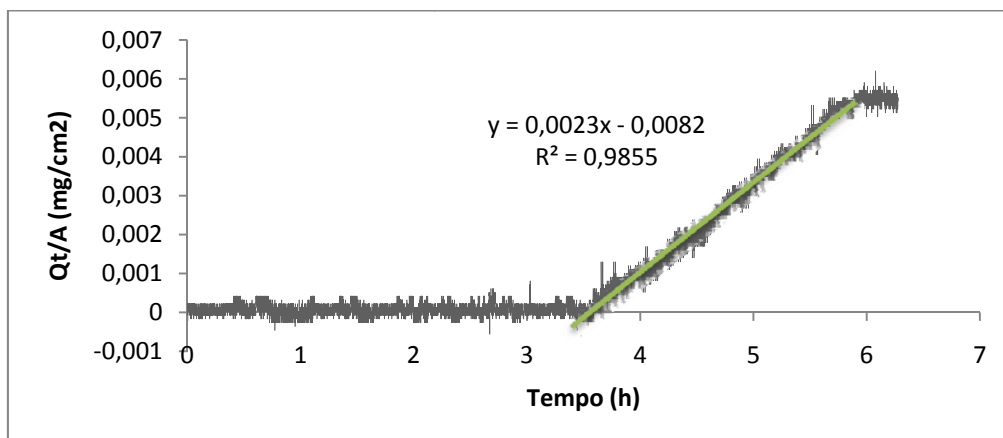


Figura 4.11 – Gráfico da quantidade permeada em função do tempo para a pele humana.

Os valores obtidos para o tempo de latência, fluxo, coeficiente de difusão e coeficiente de permeação encontram-se na Tabela 4.8. O coeficiente de permeação foi calculado pela Equação (2.9), que se encontra na Seção 2.2.2.

Tabela 4.8 – Valores obtidos para o tempo de latência, coeficiente de difusão, fluxo e coeficiente de permeação para o Voltaren Emulgel® através da pele humana.

(h)	D (10^{-7} cm ² /h)	J (10^{-3} mg/cm ² .h)	P (10^{-3} cm/h)
3,565	7,892	2,3900±0,0008	0,25702±0,00008
3,538	7,967	2,5740±0,0009	0,27681±0,00009
3,619	7,744	2,1160±0,0007	0,22756±0,00007
3,574	7,868	2,3600±0,0008	0,25381±0,00008

Comparando os valores obtidos para o Voltaren Emulgel® na membrana de celofane e na membrana de pele humana, podemos ver que para a primeira o fluxo é maior mas o coeficiente de difusão é mais pequeno.

De acordo com a bibliografia [62, 63], era de esperar que assim fosse, uma vez que o maior fluxo do celofane se deve à sua estrutura ser menos densa do que a da pele.

A taxa de permeação é diferente para o celofane e para a pele, o que é explicado pelos diferentes mecanismos de permeação que existem entre as duas membranas. O diclofenac não interage com a membrana de celofane e portanto a sua passagem é feita através dos poros [62, 64]. No caso do estrato córneo, existem pelo menos três caminhos de permeação, intracelular, intercelular e de apêndice [65].

No entanto podemos observar que os valores quer do fluxo quer do coeficiente de difusão para ambas as membranas se encontram na mesma ordem de grandeza. Assim, podemos afirmar que o celofane é uma membrana modelo adequada para os estudos de permeação.

4.2.4. Avaliação do Método Desenvolvido para o Estudo da Permeação

4.2.4.1. Avaliação de possíveis Interferências provenientes dos Ingredientes das Emulsões

Como referido na Secção 3.3.7, de modo a determinar se o revestimento do cristal era selectivo para o diclofenac ou se era sensível a algum dos restantes componentes, fizeram-se algumas análises dos géis, conhecendo-se a quantidade de diclofenac presente. Não se realizaram testes à interferência dos componentes dos géis porque a percentagem destes na constituição do gel não é conhecida. Optou-se assim por estudar a resposta dos componentes todos ao mesmo tempo através da comparação de uma solução padrão de diclofenac de sódio com outra do gel em questão.

Neste trabalho foram utilizados dois géis diferentes, o Voltaren Emulgel® e o Diclofenac Cinfa®, e o procedimento foi repetido para os dois.

Antes de realizar o estudo da emulsão, foi realizada uma calibração do nosso sensor com uma solução padrão de diclofenac de sódio. Na Tabela 4.9 apresentada a seguir encontram-se os valores obtidos para a frequência antes e depois de cada injeção, assim como o volume total acumulado da solução adicionada, bem como a concentração de diclofenac de sódio correspondente a este, e a variação total da frequência ($\Delta F_{\text{acumulado}}$).

Tabela 4.9 – Valores obtidos para a calibração da acumulação da concentração de diclofenac de sódio.

$V_{\text{acumulado}}$ (μL)	C (ppm)	F_i (Hz)	F_f (Hz)	$\Delta F_{\text{acumulado}}$
3	30	8978590	8978582	8
6	60	8978585	8978577	17
9	90	8978578	8978570	26
12	120	8978571	8978565	33
15	150	8978566	8978558	41
18	180	8978560	8978553	51

A partir dos valores da tabela anterior, foi possível representar graficamente a variação da frequência acumulada em função da concentração, obtendo-se assim a recta de calibração representada na Figura 4.9.

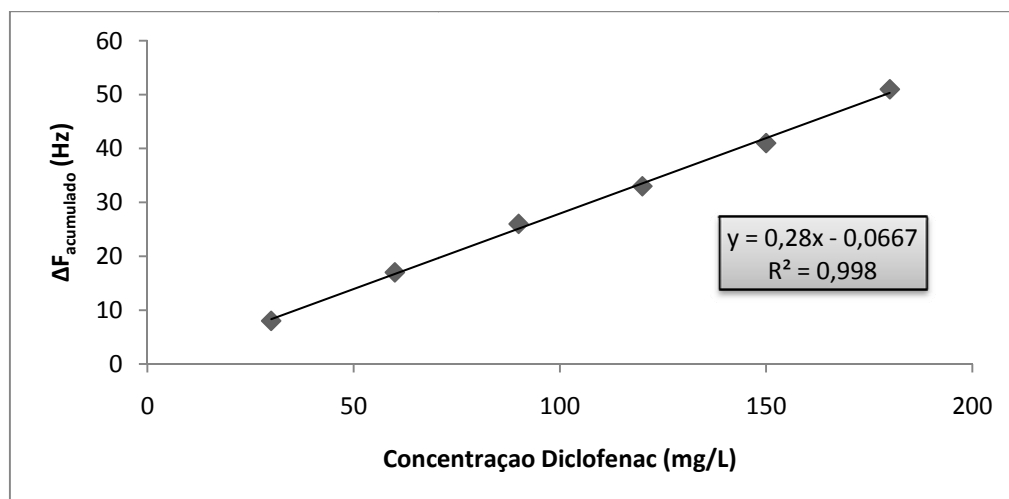


Figura 4.12 – Recta de calibração para os testes aos componentes do gel.

Depois de realizada a calibração do sensor reenchou-se a célula com solução tampão fosfato 0,05M a pH 7,4 para realizar o estudo das possíveis interferências aos componentes. Fizeram-se injeções de 15 μ L da solução preparada com o gel, que corresponde a uma concentração de 90ppm de diclofenac. Esta concentração encontra-se no centróide da recta de calibração. Foram analisadas 5 réplicas de cada um dos géis utilizados. O gel em questão e o respectivo decréscimo da frequência média encontram-se na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Valores médios de resposta para as soluções dos géis.

Gel	Frequência média de resposta após a injeção (Hz)
<i>Voltaren Emulgel</i>	25
<i>Diclofenac Cinfa</i>	24

Podemos verificar, através da equação da recta da calibração, que a resposta do sensor para 90ppm é de 26Hz, valor do qual a nossa resposta média para a emulsão se aproxima. Considerámos assim que o revestimento do nosso cristal responde apenas ao diclofenac existente no gel e a mais nenhum dos outros componentes.

4.2.4.2. Comparação com Resultados da Literatura

Sintov *et al.* [32] realizaram um trabalho no qual o estudo do Voltaren Emulgel® foi feito utilizando várias amostras de pele de origem diferente. Na Tabela 4.11 encontram-se os valores do fluxo e do coeficiente de permeação obtidos pelos autores, assim como o resultado da média dos obtidos neste trabalho para a pele humana.

Tabela 4.11 – Valores obtidos por Sintov *et al.* [32] para o fluxo e para o coeficiente de permeação com a pele de porco e rato e os resultados obtidos para a pele humana neste trabalho.

Origem da Pele	J (10^{-3} mg/cm ² .h)	P (10^{-3} cm/h)
Orelha de porco congelada	2,10±1,51	0,21±0,15
Orelha de porco refrigerada	2,63±1,00	0,26±0,10
Orelha de porco fresca	2,06±0,68	0,20±0,07
Abdómen de porco	0,05±0,03	0,005±0,003
Abdómen de rato fresco	31,66±4,45	3,17±0,44
Abdómen de rato congelado	22,73±2,26	2,27±0,22
Humana	2,360±0,003	0,2538±0,0003

Analisando os valores, pode-se verificar que a pele da orelha de porco é a que apresenta valores de fluxo e coeficiente de permeação mais próximos da pele humana. Assim, conclui-se que na ausência de pele humana, esta deverá ser preferencialmente substituída por orelha de porco.

R. Boinpally *et al.* [66] realizaram também um trabalho de permeação do Voveran Emulgel® (nome comercial do Voltaren na Índia) através da pele. Na Tabela 4.12 encontram-se os resultados dos autores para o tempo de latência e para o fluxo, bem como os resultados da média obtidos para o Voltaren Emulgel® neste trabalho.

Tabela 4.12 – Valores obtidos para o tempo de latência e fluxo do Voltaren Emulgel.

	θ (h)	J (10^{-3} mg/cm ² .h)
Voveran (R. Boinpally <i>et al.</i>)	3,64 ± 0,73	2,36 ± 0,32
Voltaren Emulgel	3,59 ± 0,07	2,360 ± 0,003

Examinando a tabela anterior, podemos verificar que a média dos nossos resultados está em concordância com os resultados encontrados na bibliografia. Assim, podemos dizer que o método por nós utilizado é exacto, mas mais preciso.

5. Conclusão

Embora se tenham encontrado dificuldades ao longo do trabalho, o objectivo principal da sua realização foi conseguido. De facto, é possível a utilização do método das microbalanças de cristais de quartzo nos testes de permeação.

Foram realizados testes de permeação a uma solução de diclofenac de sódio com diferentes concentrações na câmara doadora. Concluiu-se neste estudo que o coeficiente de difusão é independente da concentração.

Efectuaram-se também estudos de permeação a duas emulsões comerciais de diclofenac e foram testadas duas membranas diferentes: celofane e pele humana.

Relativamente ao estudo dos géis na membrana de celofane, foi possível verificar que o Diclofenac Gel Cinfa® apresenta maior coeficiente de difusão ($4,53 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{h}$) e fluxo de permeação ($9,65 \times 10^{-3} \text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) que os observados para o Voltaren Emulgel®, $3,63 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{h}$ e $4,37 \times 10^{-3} \text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, respectivamente. Estas diferenças são devidas às formulações dos géis, que pela quantidade de água, álcoois e outros potenciadores de permeação utilizados fazem variar a taxa de permeação do diclofenac no organismo.

O Voltaren Emulgel® foi utilizado também nas membranas de pele humana. Para o fluxo, o valor na membrana de celofane foi de $4,37 \times 10^{-3} \text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, enquanto na pele se obteve $2,36 \times 10^{-3} \text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Estas diferenças devem-se à estrutura menos densa da membrana de celofane e aos mecanismos de permeação de ambas as membranas. Enquanto na membrana de celofane a passagem do composto é feita meramente através dos poros, na pele a permeação é também feita por mecanismos intracelulares, intercelulares e de apêndice. A utilização de vários caminhos de passagem através do estrato córneo permite uma maior entrega transdérmica do diclofenac. Quanto ao coeficiente de difusão, no celofane de espessura $0,023 \text{mm}$, obteve-se um valor de $3,63 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{h}$, enquanto na pele humana, com uma espessura mais grossa ($0,046 \text{mm}$) este foi de $7,84 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{h}$.

Apesar das diferenças observadas entre as duas membranas, podemos concluir que o celofane apresenta coeficientes de difusão da mesma ordem de grandeza que a pele e portanto, poderá ser um modelo válido para a realização de testes de permeação. Contudo, foi mostrado através da literatura [32] que aquando da ausência de pele humana, esta deverá ser preferencialmente substituída por pele de orelha de porco.

Quanto aos valores obtidos para a pele, podemos verificar que estes se encontram muito próximos aos encontrados na bibliografia [66] o que prova que o método desenvolvido conduz a resultados exactos. Verificou-se ainda que o novo método melhorou a precisão.

O revestimento escolhido para este trabalho mostrou ser indicado para este tipo de testes. Para além de permitir vibração do cristal em água Mili-Q e na solução tampão fosfato, este responde apenas ao diclofenac do gel ignorando todos os outros componentes da sua formulação.

Nos métodos utilizados na literatura para os testes de permeação, os estudos são realizados pela recolha de amostras através da célula de difusão e a sua substituição é feita por aliquotas de solução à mesma temperatura. Este facto traduz-se obviamente na alteração das condições de permeação.

Com a utilização da microbalança de cristais de quartzo as leituras são realizadas em tempo real, não alterando o sistema e mantendo as condições de permeação.

Para além destas vantagens, o método é ainda económico, simples e versátil, sendo reutilizável e adaptando-se aos objectivos pretendidos. Contudo, como qualquer outro método analítico, apresenta algumas desvantagens. Uma delas é a extrema sensibilidade a variações de temperatura, mesmo com a variação de décimas de grau, outra é a interferência por parte de outros aparelhos electrónicos próximos, ou mesmo cabos que possam servir como antenas e captar frequências de outras proveniências. Na verdade, o ruído é o principal problema, sendo muitas vezes difícil de eliminar por não se conseguir identificar a sua origem.

Este sistema pode ser aplicado a outros fármacos, já que este tipo de sensores permite adaptação às condições pretendidas, escolhendo-se para o efeito um revestimento que interaja com o composto que se pretende analisar.

6. Bibliografia

- [1] S.C. Chattaraj, J. Swarbrick, I. Kanfer, *A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms*, Int. J. Pharm. 120 (1995) 119-124.
- [2] L. Rubio, C. Alonso, G. Rodríguez, L. Barbosa-Barros, L. Coderch, A. de la Maza, J.L. Parra, O. López, *Bicellar systems for in vitro percutaneous absorption of diclofenac*, Int. J. Pharm. 386 (2010) 108-113.
- [3] M. Suwalsky, M. Manrique, F. Villena, C.P. Sotomayor, *Structural effects in vitro of the anti-inflammatory drug diclofenac on human erythrocytes and molecular models of cell membranes*, Biophysical Chem. 141 (2009) 34-40.
- [4] J.S. Souza, M.F. Ferrão, *Aplicações de espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte 1: Dosagem por regressão multivariada*, Rev. Bras. Cienc. Farm. 42 (2006) 437-445.
- [5] R.L. Souza, *Análise quantitativa de diclofenaco em preparações farmacêuticas*, Universidade Estadual de Campinas, 2004 (Dissertação de Mestrado).
- [6] M. Tubino, R.L. Souza, *Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry*, Talanta 68 (2006) 776-780.
- [7] H. Piao, N. Kamiya, A. Hirata, T. Fujii, M. Goto, *A novel oil-in-water nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium*, Pharm. Res. 25 (2008) 896-901.
- [8] A. Nokhodchi, H. Nazemiyeh, T. Ghafourian, D. Hassan-Zadeh, H. Valizadeh, L.A.S. Bahary, *The effect of glycyrrhizin on the release rate and skin penetration of diclofenac sodium from topical formulations*, Il Farmaco 57 (2002) 883-888.
- [9] M.M. Sena, Z.F. Chaudhry, C.H. Collins, R.J. Poppi, *Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression*, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 743-749.

- [10]C. Arcelloni, R. Lanzi, S. Pedercini, G. Molteni, I. Fermo, A. Pontiroli, R. Paroni, *High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction*, J. Chrom. B 763 (2001) 195-200.
- [11]M. Shamsipur, F. Jalali, S. Ershad, *Preparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids*, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 943-947.
- [12]Y. Bazel, I. Hunka, Z. Kormosh, V. Andruch, *Spectrophotometric determination of [2-(2,6-dichlorophenylamino)-phenyl]-acetic acid in pure form and in pharmaceuticals*, Spect. Acta Part A 74 (2009) 1209-1214.
- [13]G. Cevc, G. Blume, *New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drugs carriers, transfersomes*, Bioch. Biophys. Acta 1514 (2001) 191-205.
- [14]P.A. Todd, E.M. Sorkin, *Diclofenac sodium: a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy*, Drugs 35 (1988) 244-285.
- [15]R.E. Small, *Drug reviews: Diclofenac sodium*, J. Clin. Pharm. 8 (1989) 545-558.
- [16]X.D. Dong, P. Svensson, B.E. Cairns, *The analgesic action of topical diclofenac may be mediated through peripheral NMDA receptor antagonism*, Pain 147 (2009) 36-45.
- [17]V.R. Goskonda, M.A. Khan, C.M. Hutak, I.K. Reddy, *Permeability characteristics of novel mydriatic agents using in vitro cell culture model that utilizes porcine rabbit corneal cells*, J. Pharm. Sci. 88 (1999) 180-184.
- [18]H. Epstein, *Cosmeceutical vehicles*, Clin. Derm. 27 (2009) 453-460.
- [19]P. Karande, S. Mitragotri, *Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals*, Biochem. Biophys. Acta 1788 (2009) 2362-2373.

- [20]A. Arrelano, S. Santoyo, C. Martín, P. Ygartua, *Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels*, Euro. J. Pharm. Sci. 7 (1988) 129-135.
- [21]T.R. Mollee, A.J. Bracken, *A model of solute transport through stratum corneum using solute capture and release*, Bul. Math. Bio. 69 (2007) 1887-1907.
- [22]J. Shim, H.S. Kang, W.S. Park, S.H. Han, J. Kim, I.S. Chang, *Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles*, J. Control. Rel. 97 (2004), pp. 477-484.
- [23]<http://1.bp.blogspot.com/> (Consultado a 18/10/2010)
- [24]C.A. M. Oliveira, *Estudos de permeação através da pele*, Universidade de Aveiro, 2009 (Tese de Mestrado).
- [25]B. Flaconnèche, J. Martin, M.H. Klopffer, *Transport Properties of Gases in Polymers: Experimental Methods*, Oil & Gas Sci. Tech. 56 (2001) 245-259.
- [26]P. Atkins, J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*. 2ª Edição, Oxford University Press, New York, 2002.
- [27]J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2ª Edição, Clarendon Press, Oxford, 1979.
- [28]E.L. Cussler, *Diffusion: Mass transfer in fluid system*, Cambridge University, 2ª Edição, 1997.
- [29]R. Simpson, C. Acevedo, S. Almonacid, *Mass Transfer of CO₂ in MAP Systems: Advances for Non-Respiring Foods*, J. Food Eng. 92 (2009) 233-23.
- [30]A. Henning, U.F. Schaefer, D. Neumann, *Potential pitfalls in skin permeation experiments: influence of experimental factors and subsequent data evaluation*, E. J. Pharm. Biopharm. 72 (2009) 324-331

- [31]K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, *Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro*, E. J. Pharm. Biopharm. 52 (2001) 103-112.
- [32]G. Choudalakis, A.D. Gotsis, *Permeability of Polymer/Clay Nanocomposites: A Review*, E. Pol. J. 45 (2009) 967-984.
- [33]G.L. Flynn, B. Stewart, *Percutaneous drug penetration: choosing candidates for transdermal development*, Drug Development Research 13 (1988) 169-185.
- [34]A.C. Sintov, S. Botner, *Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems*, Int. J. Pharm. 311 (2006) 55-62.
- [35]M. Cohen-Avrahami, A. Aserin, N. Garti, *H_{II} mesophase and peptidecell-penetrating enhancers for improved transdermal delivery of sodium diclofenac*, Colloids and Surfaces B 77 (2010) 131-138.
- [36]A.A. Attama, S. Reichl, C.C. Müller-Goymann, *Diclofenac sodium delivery to the eye: In vitro evaluation of novel solid lipidnanoparticle formulation using human cornea construct*, Int. J. Pharm. 355 (2008) 307-313.
- [37]A.A. Matin, M.A. Farajzadeh, A. Jouyban, *A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations*, II Farmaco 60 (2005) 855-858.
- [38]S. Agatonovi'c-Krustin, L. Zivanovic, M. Zecevi'c, D. Radulovi'c, *Spectrophotometric study of diclofenac Fe(III) complex*, J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (1997) 147-153.
- [39]J.C. Botello, G. Pérez-Caballero, *Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue*, Talanta 42 (1995) 105-108.

- [40]R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, Determination of diclofenac salts in pharmaceutical formulations, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998) 577-582.
- [41]S. Mazurek, R. Szostak, *Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1235-1242.
- [42]R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, *DSC in the chemical analysis of drugs- Determination of diclofenac in pharmaceutical formulations*, *J. Therm. Anal. Cal.* 61 (2000) 369-376.
- [43]A.O. Santini, H.R. Pezza, L. Pezza, *Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix*, *Talanta* 68 (2006) 636-642.
- [44]R. Maleki, A.A. Matin, R. Hosseinzadeh, A. Jouyban, PVC membrane sensor for diclofenac: applications in pharmaceutical analysis and drug binding studies, *Pharmazie* 62 (2007) 672-677.
- [45]Z. Kormosh, I. Hunka, Y. Bazel, *Potentiometric determination of diclofenac in pharmaceutical formulation by membrane electrode based on ion associate with base dye*, *Chin. Chem. Letters* 18 (2007) 1103-1106.
- [46]J. Klimeš, J. Sochor, P. Doležal, J. Körner, *HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations*, *Int. J. Pharm.* 217 (2001) 153-160.
- [47]A. Manosroi, P. Jantrawut, J. Manosroi, *Anti-inflammatory activity of gel containing novel elastic niosomes entrapped with diclofenac diethylammonium*, *Int. J. Pharm.* 360 (2008) 156-163.
- [48]R. Roškar, V. Kmetec, *Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid*, *J. Chrom. B* 788 (2003) 57-64.

- [49]Skoog, Holler, Nieman, Principles of Instrumental Analysis, Harcourt Brace & Company, 1998.
- [50]C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault, *Commercial quartz crystal microbalances- theory and applications*, Biosensors and Bioelectronics 14 (1999) 663-670.
- [51]M.T.S.R. Gomes, *Desenvolvimento de sensores baseados em microbalanças de cristais piezoelétricos para a determinação de CO₂ e SO₂*, Universidade de Aveiro, 1996 (Tese de Doutoramento).
- [52]R.L. Bunde, E.J. Jarvi, J.J. Rosentreter, *Piezoelectric quartz crystal biosensors*, Talanta 46 (1998) 1223-1236.
- [53]J.F. Alder, J.J. McCallum, *Piezoelectric crystals for mass and chemical measurements: a review*, Analyst 108 (1983) 1169-1189.
- [54]G.N.M. Ferreira, A.C.C.B. Tomé (2009) *Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance*, Trends in Biotechnology 27 (2009) 689-697.
- [55]V.M. Mecea, *Is quartz crystal microbalance really a mass sensor?*, Sensors and Actuators A 128 (2006) 270-277.
- [56]P.L. Konash, G.J. Bastiaans, *Piezoelectric-crystals as detectors in liquidchromatography*, Anal. Chem. 52 (1980) 1929-1931.
- [57]T. Nomura, M. Okuhara, *Frequency-shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids*, Analytical Chemistry Acta 142 (1982) 281-284.
- [58]K.K. Kanazawa, J.G. Gordon, *Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid*, Anal. Chem. 57 (1985) 177-1771.

- [59] M.I.D.S. Veríssimo, *Aplicações analíticas de sensores de massa baseados em diferentes substratos piezoelétricos*, Universidade de Aveiro, 2003 (Tese de Doutoramento).
- [60] openwetware.org/wiki/Phosphate_buffer (Consultado a 20/10/2010).
- [61] M.B. Brown, M. Hanpanitcharoen, G.P. Martin, *An in vitro investigation into the effect of glycosaminoglycans on the skin partitioning and deposition of NSAIDs*, Int. J. Pharm. 225 (2001) 113-121.
- [62] J.Y. Fang, K.C. Sung, H.H. Lin, C.L. Fang, *Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies*, Int. J. Pharm. 178 (1999) 83-92.
- [63] M. Ansari, M. Kazemipour, M. Aklami, *The study of drug permeation through natural membranes*, Int. J. Pharm. 327 (2006) 6-11.
- [64] T. Hatanaka, M. Imuna, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, *Prediction of skin permeability of drugs: Comparison with artificial membrane*, Chem. Pharm. Bull. 38 (1990) 3452-3459.
- [65] Y. Maitani, M. Kugo, T. Nagai, *Permeation of diclofenac salts through silicone membrane: a mechanistic study of percutaneous absorption of ionizable drugs*, Chem. Pharm. Bull. 42 (1994) 1297-1301.
- [66] R.R. Boinpally, S.L. Zhou, S. Poondru, G. Devraj, B.R. Jasti, *Lecithin vesicles for topical delivery of diclofenac*, Euro. J. Pharm. Biopharm. 56 (2003) 389-392.

